

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Untersuchungen zum Effekt von Glukose, Glukosedegradationsprodukten und alternativen osmotischen Agenzien in Peritonealdialyselösungen auf Vitalität und Synthesefunktion peritonealer Mesothelzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Thorsten Onno Bender
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Achim Jörres
2. Prof. Dr. med. Christoph Aufricht
3. Prof. Dr. med. Michael Fischereder

Datum der Promotion: 18.03.2005

Zusammenfassung

Konventionelle hitzesterilisierte, glukosehaltige Peritonealdialyselösungen (PDL) sind aufgrund ihres niedrigen pH-Wertes, ihrer hohen Glukosekonzentration und Osmolalität und ihres Gehaltes an Glukosedegradationsprodukten (GDP) bioinkompatibel. Alternativen zu glukosehaltigen PDL stellen aminosäuren- oder icodextrinhaltige PDL dar. Daneben enthalten auch neuere Glukose-PDL in Doppelkammersystemen aufgrund der Sterilisation von Glukose bei sehr niedrigem pH nur noch sehr geringe GDP-Konzentrationen. In dieser Arbeit wurden die akuten und chronischen Wirkungen verschiedener PDL auf humane peritoneale Mesothelzellen (HPMC) untersucht. Konfluente HPMC wurden mit den zu testenden PDL (glukosehaltige hitze- versus filtersterilisierte und konventionelle versus Doppelkammer-Glukose-PDL, 1% Aminosäuren-PDL und Icodextrin - alle bei neutralem pH-Wert) akut (1-4 Stunden Präinkubation) bzw. chronisch (bis zu 10 Tage) inkubiert. Die Zellvitalität (MTT-Assay) und IL-1beta-stimulierte Sekretion von IL-6 (Zellfunktion) wurden untersucht. Die akute und chronische Exposition von HPMC gegenüber hitzesterilisierten Peritonealdialyselösungen führte zu einer signifikanten Reduktion von Vitalität und Funktion der Zellen. Demgegenüber führte die Inkubation mit filtersterilisierten PDL und GDP-armen PDL zu einer weniger starken Beeinflussung von Vitalität und Funktion. Die aminosäurenhaltige PDL beeinflusste weder akut noch chronisch die Vitalität bzw. Funktion der Zellen negativ. Hingegen unterschied sich die icodextrinhaltige Lösung nicht wesentlich von der hitzesterilisierten PDL mit hohem Glukoseanteil. Die Verringerung des Gehaltes an GDP in PDL mittels Filtersterilisation bzw. alternativer Sterilisation in Zweikammerbeuteln hat einen positiven Einfluss auf Vitalität und Funktion von HPMC in vitro. Der Ersatz des osmotischen Agens hingegen bedeutet nicht zwangsläufig eine bessere Biokompatibilität.

Schlagwörter: Peritonealdialyse, Glukosedegradationsprodukte, Hitzesterilisation, Filtersterilisation, Icodextrin, Aminobis, Balance

Abstract

Conventional heat-sterilized glucose-containing peritoneal dialysis fluids (PDF) are bioincompatible due to their acidic pH, high glucose concentration and resulting hyperosmolality, and the presence of glucose degradation products (GDP). Alternatives to these solutions are PDL containing amino acids or icodextrin as the osmotic agent. Furthermore, novel glucose-based PDF contain only trace amounts of GDPs due to the sterilisation of glucose at very low pH in a dual-chamber container system. The present study examines the acute and chronic effects of different PDL on human peritoneal mesothelial cells (HPMC). Confluent HPMC were exposed to the different test PDF (glucose containing heat- versus filter-sterilised PDF and conventional versus dual-chambered glucose PDF, 1% amino-acid PDF and icodextrin – all at neutral pH) in an acute (1-4 hours preincubation) and chronic (up to 10 days) cell culture model. Cell viability (MTT assay) and IL-1beta stimulated IL-6 (cell function) release were assessed. Acute and chronic exposure of HPMC to heat-sterilised PDF resulted in a significant reduction of viability and cell function. In contrast, the incubation of filter-sterilised PDF and dual chambered low GDP solution had only minor effects on cell viability and function. Neither viability nor cell function were negatively affected by the amino-acid PDF following acute and chronic exposure. However, incubation with icodextrin resulted in a similar degree of inhibition as compared to incubation with conventional heat-sterilised glucose PDF. In conclusion, removal of GDP from PDF either via filter-sterilisation or manufacture in dual chambered containers helps to conserve viability and function of HPMC in vitro. However, the replacement of the osmotic agent per se does not necessarily result in improved biocompatibility.

keywords: peritoneal dialysis, glucose degradation products, heat sterilisation, filter sterilisation, Icodextrin, Aminobic, Balance

Widmung

Die Arbeit widme ich meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Akute und chronische Niereninsuffizienz.....	13
1.2	Wahl des Nierenersatzverfahrens	15
1.2.1	Hämodialyse	16
1.2.2	Peritonealdialyse (CAPD):	16
1.2.2.1	Prinzip:	16
1.2.2.2	Aufbau des Peritoneum (Ultrastruktur und Zellpopulationen der Peritoneal- membran):	17
1.2.2.3	Peritoneale Abwehrmechanismen:	19
1.2.2.4	Die Wirkung von Peritonealdialyselösungen (PDL):.....	23
1.2.2.4.1	Glukose als osmotisches Agenz in PDL:	24
1.2.2.4.2	Alternative osmotische Agenzien:	33
2	Fragestellung.....	37
3	Material und Methoden	38
3.1	Material	38
3.2	Peritoneale Zellkultur:	40
3.2.1	Präparation von humanem Omentum Majus und Gewinnung von humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC):	40
3.2.2	Passagierung der konfluenten Zellen	41
3.2.3	Charakterisierung von humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC):	42
3.2.4	Inkubationsexperimente mit Peritonealdialyselösungen (PDL)	43
3.2.4.1	Glukose als osmotisches Agenz – alternativ sterilisierte Glukose-PDL im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Präinkubationsexperimente für ein und vier Stunden	43
3.2.4.2	Glukose als osmotisches Agenz – alternativ sterilisierte Glukose-PDL im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Chronische Inkubation für bis zu zehn Tage.....	44
3.2.4.3	Alternative osmotische Agenzien im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Präinkubationsexperimente für 1 und 4 Stunden.....	45
3.2.4.4	Alternative osmotische Agenzien im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Chronische Inkubation für bis zu zehn Tage	46
3.3	Enzymimmunoassay (ELISA) für Interleukin-6	47

3.3.1	Herstellung des IL-6 Standards:	48
3.3.2	Herstellung des polyklonalen Ziege-anti-human-IL-6-Antikörper gekoppelt an Biotin:	48
3.3.3	Herstellung der TMB-Substratlösung:	48
3.3.4	Herstellung des Beschichtungspuffers	49
3.3.5	Praktische Durchführung des ELISA für IL-6	49
3.4	MTT-Assay	49
3.4.1	Herstellung der MTT-Lösung	50
3.4.2	Herstellung des Lysepuffers	50
3.5	Proteinbestimmung	50
3.6	Statistische Analysen	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Glukose als osmotisches Agenz – alternativ sterilisierte Glukose-PDL im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL	51
4.1.1	Niedrigglukosehaltige PDL (1.5% Glukose) - Präinkubation	51
4.1.2	Niedrigglukosehaltige PDL (1.5% Glukose) – chronische Inkubation	52
4.1.3	Hochglukosehaltige PDL (4.25% Glukose) - Präinkubation	54
4.1.4	Hochglukosehaltige PDL (4.25% Glukose) – chronische Inkubation	55
4.1.5	Phasenkontrastmikroskopie von humanen peritonealen Mesothelzellen, die chronisch mit verschieden sterilisierten Peritonealdialyselösungen behandelt wurden.	57
4.2	Alternative osmotische Agenzien im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL	58
4.2.1	Alternative osmotische Agenzien – Präinkubation	58
4.2.2	Alternative osmotische Agenzien – chronische Inkubation	60
5	Diskussion	62
5.1	Ergebnisdiskussion	62
5.1.1	Glukose als osmotisches Agenz	62
5.1.1.1	Akute Effekte von glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen:	63
5.1.1.2	Chronische Effekte von glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen	64
5.1.2	Akute und chronische Effekte von aminosäurehaltigen Peritonealdialyselösungen:	69
5.1.3	Akute und chronische Effekte von icodextrinhaltigen Peritonealdialyselösungen:	72
5.2	Methodenkritik - Grenzen des in vitro Zellkulturmodells	76

6	Zusammenfassung:.....	78
7	Literaturverzeichnis	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell des Zytokinnetzwerkes und der chemotaktischen Interaktion der residenten und nicht residenten peritonealen Zellen. (Abkürzungen siehe Tabelle der Abkürzungen)	23
Abbildung 2: Beispiel einer zweikammrigen Peritonealdialyselösung Balance (Fresenius)	31
Abbildung 3: Einfluss unterschiedlicher FKS-Konzentrationen auf die Morphologie und den Zellproteingehalt von HPMC nach bis zu 36 Tagen.	42
Abbildung 4: Versuchsanordnung für die Präinkubationsexperimente mit glukosehaltigen PDL.	44
Abbildung 5: Versuchsanordnung für die chronischen Experimente mit glukosehaltigen PDL.	45
Abbildung 6: Versuchsanordnung für die Präinkubationsexperimente mit glukosehaltigen versus alternativen PDL.	46
Abbildung 7: Versuchsanordnung für die chronischen Experimente mit glukosehaltigen versus alternativen PDL.	47
Abbildung 8: Zellvitalität von HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199.	51
Abbildung 9: Freisetzung von IL-6 aus HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199 unter Stimulation mit rekombinantem IL-1 β .	52
Abbildung 10: Zellvitalität von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose) über zehn Tage.	53
Abbildung 11: IL-6-Freisetzung von HPMC chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose) über zehn Tage.	53
Abbildung 12: Zellvitalität von HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199.	54
Abbildung 13: Freisetzung von IL-6 aus HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199 unter Stimulation mit rekombinantem IL-1 β .	55
Abbildung 14: Zellvitalität von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose) über zehn Tage.	56

Abbildung 15: IL-6-Freisetzung von HPMC chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose) über zehn Tage.	56
Abbildung 16: Phasenkontrastmikroskopie von humanen peritonealen Mesothelzellen, die chronisch mit verschiedenen sterilisierten Peritonealdialyselösungen behandelt wurden.	57
Abbildung 17: Zellvitalität von HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL, gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199.	59
Abbildung 18:: Freisetzung von IL-6 aus HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL, gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199 unter Stimulation mit rekombinantem IL-1 β .	59
Abbildung 19: Zellvitalität von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL über 10 Tage.	60
Abbildung 20: IL-6-Freisetzung von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL über 10 Tage.	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz nach den K/DOQI-Empfehlungen	14
Tabelle 2: Bislang bekannte Glukosedegradationsprodukte (GDP) in pharmazeutischen Glukoselösungen (*Stern markiert bislang nachgewiesene GDP in PDL).....	27
Tabelle 3: Alternative glukosehaltige PDL führender Hersteller	30
Tabelle 4: Zusammensetzung der Testlösungen	39
Tabelle 5: Vergleich des Inhaltes einiger GDP in Balance low/high versus CAPD2/3.....	67

Abkürzungsverzeichnis

AGE	advanced glycation end products
APD	automatisierte Peritonealdialyse
CAPD	kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse
GDP	Glukosedeградationsprodukte
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HD	Hämodialyse
HPFB	humane peritoneale Fibroblasten
HPLC	high performance liquid chromatography
HPMC	humane peritoneale Mesothelzellen
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IL-2	Interleukin-2
IL-3	Interleukin-3
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
Kt/V	Harnstoffclearance (Dialysatorharnstoffclearance[l/h]*Dialysedauer[h]/ Harnstoffverteilungsvolumen[l])
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
NaOH	Natriumhydroxid
PBMC	periphere mononukleäre Leukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PD	Peritonealdialyse
PDL	Peritonealdialyselösung
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostazyklin

PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PM θ	Peritonealmakrophagen
RANTES	<u>R</u> egulated on <u>a</u> ctivation, <u>n</u> ormal <u>T</u> cell <u>e</u> xpressed, and presumably <u>s</u> ecreted
sIL-6R	löslicher IL-6-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNF β	Tumornekrosefaktor β
VEGF	vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor

1 Einleitung

Die Nieren spielen eine zentrale Rolle in der Regulation lebenswichtiger physiologischer Abläufe. Neben der Ausscheidung wasserlöslicher, nicht-proteingebundener körpereigener und körperfremder Substanzen wie Pharmaka und Gifte ist eine Hauptaufgabe der Nieren die Regulation des Elektrolyt- und Volumenhaushaltes sowie des Säuren- und Basenhaushaltes. Neben diesen Funktionen ist die Niere an der Synthese und Freisetzung unterschiedlicher Hormone und modulierender Faktoren der Blutdruckregulation beteiligt. Weiterhin erfolgt in der Niere der Abbau niedermolekularer Plasmaproteine und Peptidhormone. Außerdem ist sie Erfolgsorgan extrarenal gebildeter Hormone. Fällt die Funktion der Niere aus, so spricht man von Niereninsuffizienz, und eine Nierenersatztherapie kann erforderlich werden. Dabei unterscheidet man in eine akute und chronische Verlaufsform der Niereninsuffizienz.

1.1 Akute und chronische Niereninsuffizienz

Bei der akuten Niereninsuffizienz kommt es über Tage oder wenige Wochen rasch zum progredienten Nierenfunktionsverlust mit Versiegen der Harnsekretion und Ansteigen der Retentionswerte im Blut. Dabei unterscheidet man ursächlich das prärenale, das renale und das postrenale Nierenversagen. Die Inzidenz des akuten Nierenversagens liegt etwa bei 200/1.000.000 [1] Einwohner pro Jahr, wobei mit etwa 75% eine prärenale zirkulatorisch-ischämische Ursache des akuten Nierenversagens am häufigsten beobachtet wird [2]. Beim akuten Nierenversagen ist eine vollständige Reversibilität möglich. Hingegen kommt es bei der chronischen Niereninsuffizienz über Monate und Jahre zur irreversiblen progredienten Abnahme des Glomerulumfiltrates als Ausdruck einer durch chronische Destruktion verminderten Anzahl funktionstüchtiger Nephrone. Am Ende der chronischen Niereninsuffizienz steht die terminale Niereninsuffizienz, die unbehandelt zum Tode führt und eine Nierenersatztherapie in Form von Dialyse oder Nierentransplantation erforderlich macht. Die häufigsten Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz in Deutschland sind die Glomerulonephritiden mit etwa 24%, der Diabetes mellitus mit etwa 22%, die interstitielle Nephritis mit etwa 15%, die vaskuläre Nephropathie mit etwa 11%, die kongenitalen Zystennieren mit etwa 8%, sowie weitere Ursachen [3]. Die Definition und Klassifikation der Stadien der chronischen Nierenerkrankung kann unterschiedlich erfolgen. International anerkannt ist die Klassifikation der Stadien, den amerikanischen K/DOQI-Empfehlungen [4]

entsprechend, nach der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Nach K/DOQI unterteilen wir die Stadien der chronischen Nierenerkrankung wie in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz nach den K/DOQI-Empfehlungen

Stadium 1	normale oder erhöhte GFR ($\geq 90 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
Stadium 2	leicht erniedrigte GFR (zwischen 60 und $89 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
Stadium 3	moderat erniedrigte GFR ($30\text{-}59 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
Stadium 4	schwerer Verlust der GFR ($15\text{-}29 \text{ ml/min/1.73m}^2$)
Stadium 5	kompletter Nierenfunktionsverlust mit einer GFR $<15 \text{ ml/min/1.73m}^2$

Dabei ist die chronische Nierenerkrankung definiert als ein Nierenschaden mit oder ohne Funktionseinschränkung bzw. eine GFR $<60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ für mehr als drei Monate. Der Nierenschaden ist definiert als strukturelle Veränderung (Histopathologie) oder Marker des Nierenschadens wie pathologische Blut- oder Urintests (z.B. Proteinurie/Albuminurie, Hämaturie) bzw. bildmorphologische Veränderungen. Kommt es nach Ausschöpfung der konservativen Behandlungsmöglichkeiten (Blutdrucksenkung, Eiweißrestriktion, reichliche Flüssigkeitszufuhr, Diuretikagabe, Komplikationsbehandlung) zur terminalen Niereninsuffizienz mit klinischem Fortschreiten der urämischen Symptome, ist eine Nierenersatztherapie indiziert. Dabei kommen als Behandlungsmöglichkeiten der chronisch terminalen Niereninsuffizienz die Nierenersatzverfahren, wie die Hämodialyse und die Peritonealdialyse, und die Nierentransplantation in Frage. Das Ziel vieler terminal niereninsuffizienter Patienten besteht in dem Wunsch, durch eine Nierentransplantation wieder eine weitgehende Unabhängigkeit von der Dialyse zu erreichen. Die Wartezeit auf eine Nierentransplantation beträgt in der Regel mehrere Jahre. Einer steigenden Zahl niereninsuffizienter Pat. steht eine in den letzten Jahren relativ konstant bleibende Zahl an gespendeten Nieren (Kadaverspenden, aber auch Lebendspenden unter Verwandten) gegenüber. Zudem ist das Nierentransplantatüberleben trotz moderner Immunsuppressiva in der Regel begrenzt. Daher wird die Relevanz der wissenschaftlichen Beschäftigung mit den Dialyseverfahren mit dem Ziel der Erweiterung und Verbesserung dieser Verfahren (Hämo- und Peritonealdialyse) ersichtlich.

1.2 Wahl des Nierenersatzverfahrens

Die Auswahl des Nierenersatzverfahrens hängt von vielen Faktoren ab: Es werden dabei medizinische Aspekte, wie vorhandene Nierenrestfunktion, ausreichende Ultrafiltration und „Gift“-Elimination durch das gewählte Verfahren, Möglichkeit eines Gefäßzuganges, Erfahrungen der Dialyseeinrichtung mit dem jeweiligen Verfahren, kardiovaskuläre und hämodynamische Situation, sowie nichtmedizinische Aspekte, wie Flexibilität und persönlicher Wunsch des Patienten (und/oder des medizinischen Betreuers), soziale Probleme und Kosten des Verfahrens für die Entscheidungsfindung herangezogen. Das letztendlich entscheidende medizinische Auswahlkriterium ist aber das zu erwartende Patientenüberleben. Viele Studien haben die Prognose von HD- versus PD-Patienten untersucht (Zusammenfassung siehe Van Biesen et al. [5]), wobei die endgültige Antwort auf die Frage nach dem Verfahren, welches das längstmögliche Patientenüberleben ermöglicht, aufgrund einer Vielzahl von Problemen in der Studienmethodik und Patientenauswahl schwierig zu beantworten bleibt. Die viel entscheidendere Antwort für den Patienten auf die Frage nach dem längstmöglichen Überleben sollte die richtige Auswahl der Sequenz der Nierenersatzverfahren sein, die ihm das ermöglicht. Diese Frage versucht das von Van Biesen et al. [5] vorgestellte Konzept der „integrierten Therapieannäherung für terminal niereninsuffiziente Patienten“ zu beantworten. In einer retrospektiven Studie verglichen sie das Gesamtüberleben von Patienten, die entweder mit Hämodialyse oder Peritonealdialyse begonnen hatten und fortführten oder das Verfahren jeweils wechselten. Da eine adäquate Nierenersatztherapie bei Peritonealdialysepatienten ohne eine vorhandene Restfunktion der Nieren schwierig zu erreichen ist und andererseits die Restfunktion der Nieren während der Zeit der Peritonealdialysebehandlung besser als bei der Hämodialyse erhalten bleibt, war eine zentrale Frage, ob Patienten, die mit der Peritonealdialysebehandlung begonnen hatten und dann später zur Hämodialyse wechselten, gleiche Überlebenszeiten, wie Patienten, die von Beginn an mit Hämodialyse behandelt wurden, erreichten. Diese Frage konnte eindeutig positiv beantwortet werden. Das Konzept, mit dem einen Verfahren zu beginnen und dann erforderlichenfalls zwischen den Verfahren inklusive Nierentransplantation zu wechseln, könnte eine zufriedenstellende Lösung für die zukünftige Verfügbarkeit und Kostenentwicklung der Nierenersatzverfahren bei zunehmender Anzahl an terminal niereninsuffizienten Patienten darstellen. Darüber hinaus scheint es einen Transplantatüberlebensvorteil für Patienten zu geben, die vor Transplantation mit der Peritonealdialyse behandelt wurden [6,7,8].

1.2.1 Hämodialyse

Bei der konventionellen Hämodialyse erfolgt die Elimination von urämischen Metaboliten aus dem Blut des Patienten mittels eines Dialysators innerhalb von 3-5 Stunden an 3-4 Tagen/Woche. Hierzu muß ein ausreichend großes Blutvolumen pro Zeiteinheit gereinigt werden, wozu ein entsprechender Gefäßzugang erforderlich ist. Meist werden arteriovenöse Gefäßzugänge, die sogenannten Shunts, bevorzugt am Unter- oder Oberarm, mit oder ohne Gefäßprothese angelegt. Bei der Hämodialyse findet der Stofftransport mittels Diffusion gemäß eines Konzentrationsgradienten über eine semipermeable Membran statt, die sich zwischen Blut und Dialysatlösung befindet. Um den Gradienten zwischen Blut und Dialysat möglichst groß zu halten, werden Blut und Dialysat nach dem Gegenstromprinzip geleitet. Das Dialysat wird nach einem Durchfluß verworfen. Die Porengröße der Dialysemembran definiert dabei die Durchlässigkeit für verschieden große Moleküle. Dabei werden Stoffe nicht nur eliminiert, sondern auch über das Dialysat zugeführt (z.B. Bikarbonat, Calcium und Glukose).

1.2.2 Peritonealdialyse (CAPD):

Bei der alternativ zur Hämodialyse angewandten Peritonealdialyse entfällt eine extrakorporale Blutzirkulation und das Peritoneum wird zur Entfernung der harnpflichtigen Substanzen herangezogen.

1.2.2.1 Prinzip:

Bei der Peritonealdialyse wird dem Patienten ein perkutaner Verweilkatheter (sogenannter Tenckhoffkatheter) periumbilikal in die Peritonealhöhle implantiert und im subkutanen Gewebe verankert. Über diesen Katheter instilliert sich der Pat. eine Peritonealdialyselösung (PDL), die physiologische Mengen an Natrium, (Kalium), Calcium, Magnesium, sowie Laktat als Puffer und unterschiedliche Konzentrationen an Glukose (herkömmliche PDL) enthält. Bei der häufigsten Form der Peritonealdialyse, der sogenannten kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse (CAPD) werden 2.0 – 2.5 Liter der Peritonealdialyselösung in der Regel viermal pro Tag in die Peritonealhöhle eingebracht und verbleiben dort tagsüber für etwa vier Stunden sowie für etwa zehn Stunden über Nacht. Während dieser Zeit kommt es aufgrund des durch die Glukose verursachten osmotischen Gradienten zur Ultrafiltration von Wasser in die Bauchhöhle. Dabei kommt es weiter zur Diffusion harnpflichtiger Substanzen in die PDL aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen ihr und dem Blut. Nach einigen Stunden ist ein meist völliger Ausgleich der Plasma- und Dialysatkonzentration erreicht und die

„verbrauchte“ Lösung muss gegen frische Lösung ausgetauscht werden. Begrenzt wird die Ultrafiltration des Peritoneum unter anderem durch die Absorption von etwa 1 ml/min Peritonealdialyselöung durch die diaphragmalen Lymphgefäße. Bei der CAPD erreicht man ein ungefähres Drainagevolumen von acht (4*2l) bis zehn (4*2.5l) Litern plus Ultrafiltrationsvolumen pro Tag. Bei einem angenommenem kompletten Ausgleich des Harnstoffs zwischen Blut und Dialysat erreicht man so etwa acht bis zehn Liter (plus ultrafiltrierte Menge) an Harnstoffclearance pro Tag, sowie eine von der Transportkapazität des Peritoneum abhängige Ultrafiltration von Wasser.

Alternativ gibt es zur CAPD Verfahren zur automatisierten Peritonealdialyse (APD). Bei diesen Verfahren ist der Patient zumeist unabhängig von mehrmaligen Dialysatwechseln tagsüber. Die Dialysatwechsel erfolgen hier mittels eines APD-Gerätes (sogenannter Cycler) automatisch über Nacht, während der Pat. schläft.

Bei allen Dialyseformen kann eine Restfunktion der Niere bezüglich Harnstoff- und Kreatininclearance wesentlich zur Verbesserung der Gesamtclearance beitragen. Z.B. bewirkt eine zusätzliche Clearance von 1 ml/min eine Steigerung der Clearance um 10 Liter pro Woche.

Da sich die residuale Nierenfunktion während der ersten Jahre Peritonealdialyse meist drastisch verschlechtert, muß in den meisten Fällen im Verlauf das Peritonealdialysevolumen bzw. die Glukosekonzentration in den Lösungen pro Tag erhöht werden.

Die Vorteile der Peritonealdialyse gegenüber der Hämodialyse liegen u.a. in ihrer kontinuierlichen Behandlungsmethode. Es erfolgt nahezu ständig ein Stoff- und Volumentransport über das Peritoneum. Dadurch werden stärkere, möglicherweise hämodynamisch wirksame, Volumenschwankungen vermieden. Außerdem kann auf einen Blutzugang verzichtet werden, der selbst zu Komplikationen führen kann. Ein entscheidendes Kriterium für viele Patienten ist die weitgehende Unabhängigkeit von einem Dialysezentrum, über das natürlich trotzdem die Kontrolle des Verfahrens geschehen sollte.

1.2.2.2 Aufbau des Peritoneum (Ultrastruktur und Zellpopulationen der Peritoneal-membran):

Das Peritoneum (Bauchfell) kleidet mit einem parietalen Blatt (Peritoneum parietale) die Bauch- und Beckenhöhle aus und überzieht mit einem viszeralem Blatt (Peritoneum viscerales) einen großen Teil der Bauch- und Beckenorgane. Zwischen parietalem und viszeralem Blatt liegt die Peritonealhöhle, Cavum peritonei. Das Omentum majus und Omentum minus sind Peritonealduplikaturen im Oberbauch. Unter dem Lichtmikroskop besteht das Peritoneum

apikal zunächst aus einer einfachen Schicht Mesothelzellen über einer kontinuierlichen Basalmembran. Dabei handelt es sich um flache, polygonale Zellen mit einem zentral gelegenen Kern. Die Mesothelzellen tragen an ihrer Oberfläche Mikrovilli (Durchmesser ca. $0.8\mu\text{m}$, je $2\text{--}3\mu\text{m}$ lang) in variabler Anzahl und besitzen alle in etwa die gleiche Größe. Sie haben eine regelmäßige Form und sind ca. $20\text{--}35\mu\text{m}$ dick. Sie sind polygonal angeordnet und bilden eine kontinuierliche Schicht mit den angrenzenden Zellen [9,10]. Das Mesothelium liegt dem verbindenden submesothelialen Gewebe auf, welches sowohl dem parietalen, als auch visceralen Peritoneum unterliegt. Es ist etwa $2\text{--}3\text{ mm}$ dick [10] und besteht aus gerichteten Kollagenfaserbündeln, elastischer Lamina und extrazellulärer Matrix, in dem sich insbesondere Fibroblasten, aber auch vereinzelte Makrophagen [11], Adipozyten und Mastzellen finden lassen. Nahe der Oberfläche finden sich Lymphgefäße, unterhalb der Basalmembran schließlich die versorgenden Kapillaren und Venolen.

Mit zunehmender Therapiedauer kommt es im Rahmen der Peritonealdialysebehandlung über Jahre zu signifikanten Veränderungen der Morphologie und der Ultrastruktur des Peritoneum, welche schließlich in einer Fibrosierung der Peritonealmembran münden können [12,13,14]. Damit verbunden sind dann auch Veränderungen des Stofftransportes über die Membran, welche schließlich zu ihrem Funktionsverlust als „Dialysemembran“ führen können. Morphologisch ist dabei vorwiegend das Mesothel betroffen, für das eine verstärkte Ausprägung des rauen endoplasmatischen Retikulums bei gleichzeitiger Verminderung der Oberflächenmikrovilli sowie der mikropinozytotischen Vesikel beschrieben wurde [10,15]. Seitens des Submesothels wurde eine Rarefizierung des Bindegewebes sowie eine Sklerosierung gefunden [16]. Ursächlich für die morphologischen Veränderungen werden unter anderem das urämische Milieu des Peritonealdialysepatienten gemacht. In einer neueren Studie [17] wurden die morphologischen Eigenschaften der parietalen Peritonealmembran von 130 Peritonealdialysepatienten untersucht und mit denen von normalen Individuen, Prä-dialysepatienten und Hämodialysepatienten untersucht: So konnte bei urämischen Prä-dialysepatienten sowie bei Hämodialysepatienten eine ähnlich starke Verdickung der submesothelialen Zone wie bei Peritonealdialysepatienten in den ersten zwei Jahren der Therapie gefunden werden. Diese Veränderungen waren signifikant im Vergleich zu der Beschaffenheit des Peritoneum bei Nicht-Urämikern. Allerdings waren die morphologischen Veränderungen bei Peritonealdialysepatienten im Laufe der Jahre zunehmend stärker ausgeprägt im Vergleich zu den Prä- oder Hämodialysepatienten. Diese Veränderungen scheinen im direkten Zusammenhang mit den instillierten Peritonealdialyselösungen sowie den durchgemachten Peritonitisepisoden zu stehen [18]. Davies et al. [19] konnten in einer

prospektiv angelegten Studie bei 303 Patienten eines einzigen Dialysezentrums nachweisen, dass Patienten, die in den ersten Jahren einer erhöhten Menge an Glukose ausgesetzt waren, einen erhöhten peritonealen Transport und einen früheren Verlust der verbleibenden Nierenfunktion hatten.

1.2.2.3 Peritoneale Abwehrmechanismen:

Bis zu 50% der Patienten im Peritonealdialyseprogramm verlassen es innerhalb von fünf Jahren. Hauptgründe sind wiederholte Infektionen, Verlust der Transportkapazität für die Stoffe und Versagen der Ultrafiltration [20]. Trotz zahlreicher technischer Verbesserungen zur Erhöhung der Hygiene, wie verbesserte Peritonealdialysekatheter oder veränderte Konnektions-/Diskonnektionssysteme stellt die Infektion, im schlimmsten Fall die Peritonitis, das größte Akutproblem der Peritonealdialyseverfahren dar.

Die CAPD-assoziierte Peritonitis ist vom klinischen Bild meist nur oligosymptomatisch. So klagt die Mehrzahl der Patienten über abdominelle Beschwerden, häufig findet sich eine Abwehrspannung, sowie bei der Hälfte der Patienten erhöhte Temperaturen. Dabei kommt es aufgrund der vermehrten Reabsorption von Soluten und freiem Wasser während der Peritonitis zur erschwerten Flüssigkeitsbilanzierung. Gleichzeitig findet meist ein vermehrter Verlust von Plasmaeiweißen in das Peritonealdialysat statt. Die gesteigerte Reabsorption, sowie der Eiweißverlust scheinen im Zusammenhang mit einer gesteigerten Synthese von vasodilatierenden Prostanoiden (Prostaglandin E_2 [PGE_2], Prostazyklin [PGI_2]) zu stehen [21,22,23]. Klinisch primär auffällig ist zumeist die deutliche Trübung des drainierten Dialysats infolge deutlich bis massiv erhöhter peritonealer Leukozytenzahl, die zur überwiegenden Zahl (>90%) aus polymorphkernigen Granulozyten bestehen [24]. Hingegen bestehen im infektfreien Intervall die Mehrzahl (>80%) der Leukozyten aus Makrophagen.

Offensichtlich kommt der Einstrom von polymorphkernigen Granulozyten (PMN) infolge chemotaktischer Reaktionen zustande. Dabei scheinen die Peritonealmakrophagen (PM θ) eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese reagieren in vitro auf Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (Endotoxin) aus der Zellwand von gramnegativen Bakterien, sowie nach Exposition gegenüber grampositiven Organismen mit einer Synthese einer Vielzahl immunologisch aktiver Substanzen. Dabei handelt es sich überwiegend um verschiedene Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α , sowie Metaboliten des

Arachidonsäurestoffwechsels, wie PGE₂ und PGI₂ und Lipoxigenase-Produkten, wie LTB₄ und LTC₄ [11]. Einige der wichtigen Zytokine und Chemokine sind weiter unten näher erläutert. Peritonealmakrophagen haben also eine zentrale Bedeutung für die Koordinierung und Regulation der peritonealen Abwehrmechanismen. Neben den Makrophagen scheinen allerdings noch andere Zellpopulationen im Peritoneum an Infektabwehrmechanismen beteiligt zu sein, da die absolute Zahl an Peritonealmakrophagen, selbst während Peritonitisepisoden die hohen Konzentrationen an Mediatoren wie PGE₂, PGI₂ [21,22,23], IL-6 [25,26] und IL-8 [26,27], die im Peritonealeffluat gefunden werden, nicht hinreichend erklären können. Neben den Peritonealmakrophagen müssen also auch die zwei größten residenten Zellpopulationen in Betracht gezogen werden: Peritoneale Mesothelzellen und Fibroblasten.

Nach Etablierung der Gewinnung von humanen peritonealen Mesothelzellen [28] kann seit einiger Zeit die Bedeutung des peritonealen Mesothels und nach Etablierung der Gewinnung humaner peritonealer Fibroblasten [29] die Bedeutung dieser Zellpopulation in vitro charakterisiert werden. Es ist inzwischen bekannt, dass die beiden Zellpopulationen nicht nur eine Ultrafiltrationsbarriere darstellen, sondern auch aktiv durch Sekretion von Zytokinen, Prostaglandinen, Lipiden, Proteoglykanen und Wachstumsfaktoren an der peritonealen Infektabwehr beteiligt sind.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden von Topley et al. [30,31] das Modell des „intraperitonealen Zytokin-Netzwerkes“ entwickelt (Abb. 1):

Das initiale Signal geht bei einer peritonealen Entzündungsreaktion demzufolge von aktivierten Peritonealmakrophagen als „erste Verteidigungslinie“ aus, die über vergleichsweise geringe Ausschüttung (Picogramm-Bereich) an aktivierenden Signalen, wie IL-1 β und TNF α , peritoneale Mesothelzellen aktivieren. Darauf reagieren die von diesen Signalen erreichten Mesothelzellen mit der massiven Produktion (Nanogramm-Bereich) von IL-6, Chemokinen (IL-8) und Prostaglandinen. IL-8 bewirkt dabei die Rekrutierung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung. IL-6 sowie die Prostaglandine sind nicht nur proinflammatorisch, sondern auch für die Begrenzung der Entzündungsreaktion verantwortlich. Diese können nämlich die Synthese von TNF α und IL-1 β inhibieren [32,33,34].

Weniger wusste man bis vor einigen Jahren über die Rolle der Peritonealfibroblasten während der peritonealen Entzündungsreaktion. Das oben beschriebene Modell wurde dann von Jörres et al. [35] um die Rolle der Peritonealfibroblasten, als zweitgrößte Zellpopulation der Peritonealmembran, wie folgt ergänzt:

Peritonealfibroblasten werden in vitro von rekombinant hergestellten IL-1 β und/oder TNF α zur Induktion von IL-6 mRNA als auch IL-8 mRNA stimuliert, und IL-6 Protein bzw. IL-8 Protein lässt sich in Folge nachweisen. Simultan kommt es zu IL-6 und IL-8 mRNA-Expression und entsprechender Proteinsynthese nach Stimulation der HPFB mit peritonealen Makrophagenüberständen.

Zusammenfassend lässt sich die Funktion der Peritonealfibroblasten so beschreiben: Der Peritonealfibroblast reagiert auf proinflammatorische Stimulation durch Proliferation und erhöhter Synthese von Anteilen der extrazellulären Matrix und trägt damit höchstwahrscheinlich zur Peritonealfibrose bei CAPD-Patienten bei. Gleichzeitig spielt der Peritonealfibroblast durch die Produktion von immunologisch aktiven Molekülen auch selbst eine Rolle bei der peritonealen Entzündung [36].

Interleukine und Chemokine

Im Folgenden sollen kurz die wichtigsten Interleukine, die bei der Interaktion der peritonealen Zellen eine Rolle spielen, erläutert werden: Bei ruhenden peritonealen Mesothelzellen in Zellkulturen wurden u.a. nach Stimulation mit Interleukin-1 beta (IL-1 β) oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), die beide Mediatoren von aktivierten peritonealen Makrophagen sind, die Produktion von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) gefunden. Weiterhin produzieren Mesothelzellen vasodilatatorische Prostaglandine (PGE₂, PGI₂). Prostaglandinen kommen dabei neben pro- auch antiinflammatorische Aufgaben zuteil, indem sie die Produktion von IL-1 β und TNF α in aktivierten Monozyten und Makrophagen herunterregulieren [36].

IL-1 β : IL-1 β wird von aktivierten Makrophagen als erste Antwort in der peritonealen Entzündungsreaktion produziert. IL-1 β aktiviert dabei neben TNF α , peritoneale Mesothelzellen, die mit der Produktion von IL-6, IL-8 und Prostaglandinen antworten.

IL-6 und sIL-6R: Mesothelzellen und Makrophagen sind in der Lage IL-6 zu produzieren [35]. Dabei sind die HPMC die bedeutendste Quelle für die IL-6-Ausschüttung, die durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF α ausgelöst wird. IL-6 hat sowohl eine pro- als auch antiinflammatorische Rolle [37]. Man glaubt, seine Aufgabe bei der peritonealen Infektion besteht darin, die peritoneale Inflammation zu begrenzen, da man gefunden hat, dass

es die Produktion von IL-1 und TNF α in aktivierten Monozyten herunterreguliert. Es hat außerdem einen potenziell permeabilitätserhöhenden Effekt auf das Peritoneum [35]. Die antiinflammatorische Wirkung wiederum ist abhängig vom löslichen IL-6-Rezeptors (sIL-6R): Der Leukozyteneinstrom während einer Peritonitis ist durch eine frühe peritoneale Akkumulation von Neutrophilen charakterisiert. Diese werden nach und nach durch eine Population von mononukleären Zellen ersetzt. Dabei ist der Wandel in der Leukozytenrekrutierung, bei dem IL-6 und sIL-6R eine zentrale Rolle spielen, entscheidend für die erfolgreiche Bekämpfung des infektiösen Agens und der Wiederherstellung der Gewebhomeostase. Der IL-6/sIL-6R-Komplex ist für die Begrenzung der Inflammation entscheidend. HPMC tragen allerdings keinen IL-6R und sind nicht in der Lage den löslichen Rezeptor zu produzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die einwandernden Neutrophilen eine wichtige Quelle für den löslichen IL-6-Rezeptor sind und damit insgesamt für die Begrenzung der Inflammation entscheidend sind [38]. IL-6 und sIL-6R haben also insgesamt eine hohe Relevanz als Mediator beim peritonealen Abwehrmechanismus [25,26,27].

IL-8: IL-8 ist ein chemotaktisches Zytokin mit proinflammatorischer und wachstumsfördernder Aktivität. Es wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen gebildet und hat potente chemotaktische Aktivität auf Neutrophile, T-Lymphozyten und Basophile [35]. Neben dem ebenfalls stark chemotaktisch wirkenden LTB₄ [39,40] dürfte es sich bei IL-8 um einen der entscheidenden Mediatoren zur Rekrutierung von Granulozyten bei der peritonealen Infektabwehr handeln.

TNF α : TNF α ist ein Zytokin mit vielfältigen proinflammatorischen Eigenschaften [37], welches auch Fibroblasten und Mesothelzellen aktiviert. Bei CAPD-assoziiierter Peritonitis ist TNF α ergänzend zu IL-1 eines der initialen Signale für die Aktivierung der peritonealen Mesothelzellen, die mit einer Sekretion von IL-8 antworten, das für die chemotaktische Rekrutierung von polymorphnukleären Leukozyten verantwortlich ist.

Die Vorgänge, die bei dem peritonealen Abwehrmechanismus stattfinden, sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

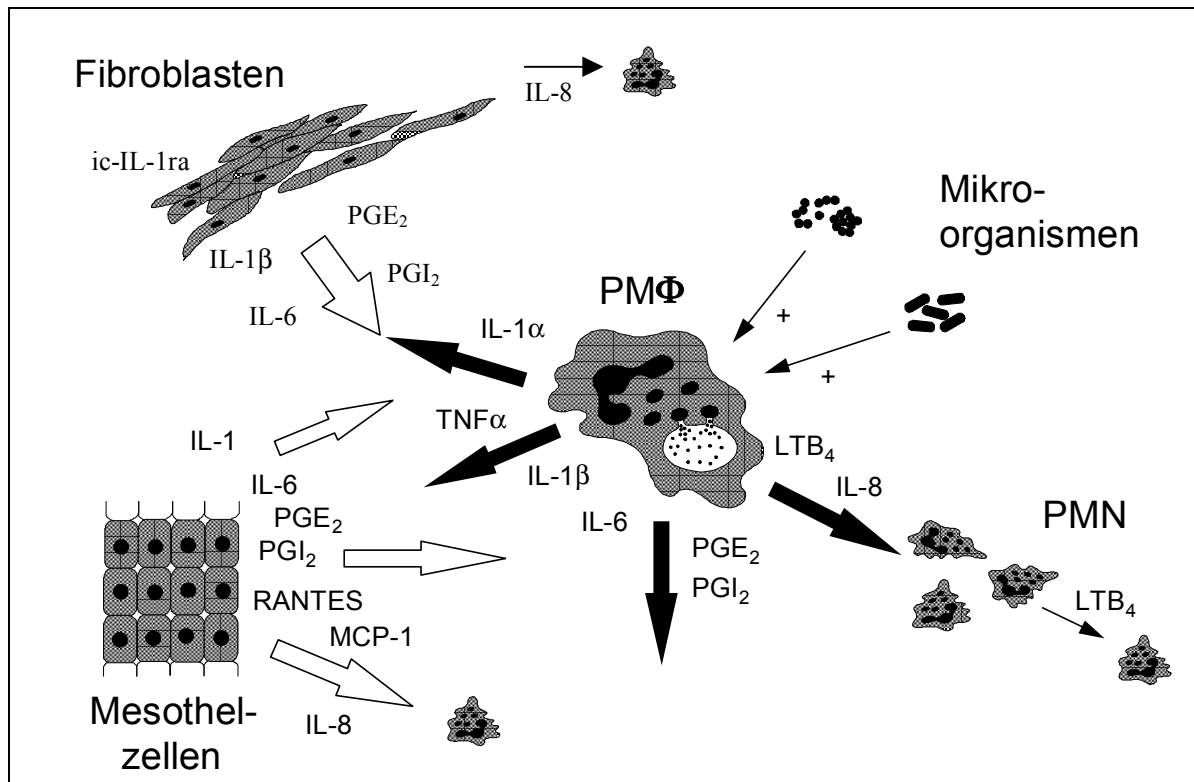


Abbildung 1: Modell des Zytokinnetzwerkes und der chemotaktischen Interaktion der residenten und nicht residenten peritonealen Zellen. (Abkürzungen siehe Tabelle der Abkürzungen)

1.2.2.4 Die Wirkung von Peritonealdialyselösungen (PDL):

Seit ca. 30 Jahren wird die Peritonealdialyse als ein möglicher Standard in der Therapie der terminalen Niereninsuffizienz eingesetzt. Dabei spielt die Integrität und die Funktion der Peritonealmembran eine entscheidende Rolle. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass die bislang gebräuchlichen herkömmlichen Peritonealdialyselösungen, die Integrität dieser Membran direkt und indirekt (s.u.) schädigen können. Die Notwendigkeit, sich mit der Frage der Einflüsse der PDL auf die Membran auseinanderzusetzen, wird leicht einsichtig, wenn man sich vor Augen führt, dass das Peritoneum im Jahr etwa 3000 Litern der Peritonealdialyselösungen ausgesetzt ist. So finden sich in Abhängigkeit vom Beginn der CAPD und Anzahl an durchgemachten Peritonitiden histologische Veränderungen bei CAPD-Patienten: Aufgrund der kontinuierlichen Schädigung der Mesothelzellen durch die Peritonealdialyselösungen kommt es bereits nach kurzer Zeit zu einem erhöhten Zellumsatz, d.h. einem erhöhten Austausch geschädigter Zellen durch neue. Die progressiven Veränderungen schließen auch die zunächst nur teilweise Reduktion oder im schlimmsten Fall das komplette Verschwinden der Mikrovilli ein. Außerdem kann es zur Öffnung von

Zellverbindungen kommen. Nach einigen Monaten CAPD zeigen sich mesotheliale Basalmembranveränderungen, die erhöhte Zeichen der Replikation aufweisen [9].

Während nach Entwicklung der Peritonealdialyse zunächst einfache intravenöse Lösungen (0.8% Natriumchlorid, 5% Dextrose und Ringerlaktatlösung) als Peritonealdialyselösungen mit Nebenwirkungen wie Lungenödem, Elektrolytstörungen und Säuren-Basenungleichgewicht zum Einsatz kamen, erkannte man später, dass die Peritonealdialyselösungen ähnliche Zusammensetzungen wie interstitielle Flüssigkeiten haben und im Verhältnis zum Blut hyperton sein müssen, um die Ultrafiltration von freiem Wasser bewerkstelligen zu können. Glukose wurde schließlich als sicheres und effektives osmotisches Agenz eingesetzt und wird bis heute als Standard in den meisten Peritonealdialyselösungen verwendet.

Die Benutzung von Glukose als osmotisches Agenz birgt aber auch zahlreiche unerwünschte Wirkungen [41], die im folgenden Abschnitt diskutiert werden. Seit einiger Zeit sind nun auch alternative osmotische Agenzien auf dem Markt, die zum Teil bereits im klinischen Gebrauch sind, sich teilweise aber auch noch in der klinischen Forschung befinden. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um aminosäuren- und icodextrinhaltige Lösungen, die für eine begrenzte Anzahl an Dialysatwechseln pro Tag alternativ zu glukosehaltigen Lösungen eingesetzt werden können.

Um dem Patienten eine möglichst lange Zeit an der Peritonealdialyse zu ermöglichen, gilt es, die für ihn bestmögliche Kombination aus nötiger Ultrafiltration, Funktionserhalt der Peritonealmembran, Ernährungszustand, sowie Komfort zu finden. Für die Zukunft stehen die Entwicklung neuer osmotischer Agenzien (z.B. Glycerol) und die Verbesserung der automatischen PD mit kontinuierlichem Fluß von PDL mit niedrigem Glukosegehalt (0.2%-0.5%) an. Das ideale osmotische Agenz muss dabei erstens eine ausreichende Ultrafiltratsleistung und ein hohes Ultrafiltrationsvolumen pro absorbierter Masse ermöglichen, zweitens leicht metabolisiert werden, ohne dabei lokale peritoneale oder systemische Toxizität aufzuweisen und muss drittens zu akzeptablen Kosten leicht hergestellt werden können (nach Holmes et al. [42]).

1.2.2.4.1 Glukose als osmotisches Agenz in PDL:

Glukose ist (mangels gleichwertiger Alternativen) das am häufigsten eingesetzte osmotische Agenz in Peritonealdialyselösungen. Sie ist als effektives osmotisches Agenz einsetzbar und kostengünstig für die breite Anwendung herstellbar. Glukose birgt, zumindest in der Verwendung in den heute gebräulichen konventionellen Zubereitungen, aber auch Gefahren.

Ein nicht unerheblicher Teil der Glukose wird nämlich absorbiert. Dies bringt metabolische Komplikationen wie Übergewicht und Hyperdyslipidämie mit Hypertriglyceridämie [20] mit sich. Es kommt aber auch zum Aminosäuren- und Proteinverlust in das Peritonealdialysat (mit unerwünschten Wirkungen wie Malnutrition und negativen Effekten auf die Stickstoffbilanz) mit einem permanenten Verlust von etwa 8 bis 15 g Gesamtprotein und 2 bis 4 g Aminosäuren pro Tag [43].

Neben diesen metabolisch ungünstigen Wirkungen gibt es aber auch direkte negative Eigenschaften der konventionellen PDL auf das Peritoneum als Dialysemembran, die nicht nur aus der Verwendung von Glukose (und der damit verbundenen erhöhten Osmolalität) per se resultieren, sondern auch abhängig von der Art der Herstellung der Lösungen und der daraus folgenden Zusammensetzung sind.

pH-Wert in Peritonealdialyselösungen

Peritonealdialyselösungen müssen beim Herstellungsprozess sterilisiert werden. Dabei wird als einfachstes und kostengünstigstes Verfahren die Hitzesterilisation angewandt. Bei hohen Temperaturen kommt es jedoch in Abhängigkeit vom pH-Wert (je höher, desto stärker) zur Degradation von Glukose [44,45]. Makroskopisch erkennt man dies am regelrechten „Karamelisieren“ der bei neutralem pH-Wert (pH7.4) sterilisierten Lösung – diese Lösung ist klinisch natürlich nicht mehr einsetzbar. Aus diesem Grund werden die Lösungen bei einem unphysiologisch niedrigen pH-Wert von zumeist 5.5 sterilisiert, welcher per se zu unerwünschten Wirkungen auf das Peritoneum führen kann. Es gibt mehrere in vitro Untersuchungen, die den negativen Einfluss von einem niedrigem pH-Wert auf Zellen zeigen [46,47]. In vivo scheint dieser negative Effekt eine untergeordnete Rolle zu spielen, da der pH-Wert durch die Äquilibration durch transperitoneale Puffersubstanzen sowie in der Bauchhöhle verbliebendes Restdialysat innerhalb von 20-30 Minuten auf nahezu neutrale Werte angehoben wird [47].

Osmolalität in Peritonealdialyselösungen

Um einen ausreichenden osmotischen Gradienten ins Dialysat zu erreichen, muss Glukose in hohen Konzentrationen verwendet werden. Die damit verbundene unphysiologisch hohe Osmolalität wird für einen weiteren Teil der Bioinkompatibilität der PDL verantwortlich gemacht: Allerdings führte die Inkubation von humanen Mesothelzellen mit Mannitol (gleiche Osmolalität wie Glukose) in steigenden Konzentrationen in vitro im Vergleich zur

Inkubation mit Glukose zu einer weniger starken Reduktion der Proliferation der Zellen [48], so dass Glukose per se eine eigene Toxizität zu haben scheint. Wieslander et al. [49] untersuchten zwei osmotisch unterschiedliche (290 mOsm/liter und 390 mOsm/liter) NaCl-Lösungen (NaCl 0,9% und NaCl 1,2%) in ihrer Wirkung auf L929 Fibroblasten. Dabei konnten sie keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Zellwachstums nach 72 Stunden feststellen, so dass die eigentliche Osmolalität keine grössere Rolle zu spielen scheint. Gotloib et al. [50] veröffentlichten Untersuchungen bezüglich des Effektes von Osmolalität auf mesotheliale Monolayer in einem in vivo Mausmodell über 30 Tage. Die Effekte, die durch die Hyperosmolalität von einer filtersterilisierten und Mannitol enthaltenden PDL an den Mesothelzellen ausgelöst wurden, waren im Gegensatz zu den durch eine hitzesterilisierte aber ansonsten identisch zusammengesetzte Glukoselösung (4.25%) gleicher Osmolalität nach einer Regenerationszeit von 7 Tagen zum größten Teil reversibel. Daraus schließen Gotloib und Mitarbeiter, dass die Effekte, die durch Glukose selbst und seine Degradationsprodukte ausgelöst werden, eine wesentlich größere Rolle spielen, als die hohe Osmolalität.

Puffer in Peritonealdialyselösungen

Um den pH-Wert in den PDL stabil zu halten, müssen die Peritonealdialyselösungen gepuffert werden. Dabei kommt in den herkömmlichen Lösungen überwiegend Laktat als Puffer zum Einsatz, für das zumindest bei niedrigem pH-Wert negative Einflüsse auf Peritonealzellen bekannt sind. Passlick-Deetjen et al. [51] beschrieben den Mechanismus, über den Laktat in vitro bei niedrigem pH-Wert der PDL den intrazellulären pH-Wert in Neutrophilen, Makrophagen [52] und Mesothzellen relativ schnell senken kann:

Normalerweise befinden sich Laktat und Milchsäure in einem Gleichgewicht, welches sich bei extrazellulär niedrigem pH in Richtung Milchsäure verändert. Diese ungeladene Form kann leicht ins Innere der Zelle gelangen und dissoziiert dann im neutralen Zellinneren in Laktat und Protonen, welche die intrazelluläre Azidifizierung bewirken. Außerdem transportiert der Laktat/Protonen Kotransporter, der in polymorphnukleären Leukozyten identifiziert wurde, in einer sauren Umgebung vermehrt Laktat ins Zellinnere. Der niedrige intrazelluläre pH führt dann möglicherweise über die Minderung von zellulärem Adenosintriphosphat [53] zur Störung der Zellfunktion.

GDP in Peritonealdialyselösungen

Neben diesen vor allem akut wirkenden negativen Effekten von PDL wie pH-Wert, Osmolalität und Laktat als Puffer, wurden erstmals von Wieslander et al. eine eher als chronisch wirkende Toxizität (auf Zellen) im Zusammenhang mit der Hitzesterilisation der Lösungen beschrieben. In dieser Arbeit sprechen Wieslander et al. [49] von einer (neben pH-Wert und Osmolalität) bestehenden „generellen Toxizität“ der hitzesterilisierten glukosehaltigen PDL. Dabei beziehen sie sich auf die unterschiedliche Wirkung von filtersterilisierten versus (zusätzlich) hitzesterilisierten, glukosehaltigen und im Labor selbst hergestellten Peritonealdialyselösungen (pH 7.3 bis 7.6 durch Mischung mit Zellkulturmedium) auf Fibroblasten der Zelllinie L-929: Nach 72 stündiger Inkubation mit diesen PDL fanden sie ein signifikant besseres Wachstum der Zellen, die mit der filtersterilisierten PDL im Vergleich zu den mit der (zusätzlich) hitzesterilisierten PDL behandelten Zellen. Eine ebenfalls eingesetzte kommerziell erhältliche hitzesterilisierte PDL wirkte nach pH-Neutralisation (Mischung mit Zellkulturmedium) ähnlich auf die Zellen, wie die im Labor hergestellte und (zusätzlich) hitzesterilisierte Lösung. Später konnte die Ursache der Toxizität hitzesterilisierter PDL identifiziert werden: Glukose wird mit zunehmender Temperatur und steigendem pH-Wert in unterschiedliche Glukosedegradationsprodukte (GDP) umgewandelt. Diese sind inzwischen zu einem Teil identifiziert und in ihrer Wirkung auf das Peritoneum untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bislang bekannte Glukosedegradationsprodukte (GDP) in pharmazeutischen Glukoselösungen (*Stern markiert bislang nachgewiesene GDP in PDL)

Glukosedegradationsprodukte (GDP)	Referenz
5-Hydroxymethylfuraldehyd*	Nilsson-Thorell et al. [54]
Acetaldehyd*	Nilsson-Thorell et al. [54]
Formaldehyd*	Nilsson-Thorell et al. [54]
2-Furaldehyd*	Nilsson-Thorell et al. [54]
Glyoxal*	Nilsson-Thorell et al. [54]
Methylglyoxal*	Nilsson-Thorell et al. [54]
Valeraldehyd*	Nilsson-Thorell et al. [54]
Ameisensäure	Wieslander et al. [55]
Levulinsäure	Jellum et al. [56]

5-Hydroxymethylfursäure	Wieslander et al. [55]
2,5-Dicarboxysäure	Wieslander et al. [55]
2-keto-3desoxy-Glucose	Jellum et al. [56]
2-(2'-hydroxyacetyl)-Furan	Jellum et al. [56]
3-deoxy-D-erythro-hexos-2-Ulose	Linden et al. [57]
3-Deoxyglucoson*	Linden et al. [57]
3,4-Dideoxyglucoson-3-Ene*	Linden et al. [58,59]

Martinson et al. (Arbeitsgruppe Wieslander) hielten die Glukosedegradationsprodukte bereits in ihrer 1992 erschienenen Veröffentlichung als relevant in bezug auf den Einfluss auf peritoneale Zellen [60]. Vor kurzem wurde die Wirkung von GDP und unterschiedlich sterilisierten PDL in vitro mit (erstmalig) humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC) untersucht [61]. Vorher waren die Versuche mit GDP nur an tierischen oder modifizierten menschlichen Zelllinien (z.B. L929 Fibroblasten) durchgeführt worden (Zusammenfassung: [61]), die für den Einfluss der GDP weniger empfindlich zu sein scheinen. Witowski et al. [61] untersuchten den akuten (24 Stunden) Effekt von GDP und unterschiedlich sterilisierten glukosehaltigen PDL auf humane peritoneale Mesothelzellen (HPMC) bezüglich ihres Wachstums, Vitalität und IL-6 Freisetzung als funktionellen Parameter. Die Zellproliferation, Vitalität und IL-1 β -stimulierte IL-6-Freisetzung der HPMC konnte dosisabhängig durch verschiedene GDP (Acetaldehyd, Formaldehyd, Glyoxal, Methylglyoxal, Furaldehyd, aber nicht 5-Hydroxymethylfurfural) inhibiert werden; dies teilweise signifikant stärker verglichen mit L929-Zellen. Diese Effekte konnten ebenfalls für die Inkubation mit hitzesterilisierter im Vergleich zu filtersterilisierter PDL gezeigt werden. Dabei wurde die Proliferation von HPMC durch filtersterilisierte PDL nach Zugabe von GDP gehemmt, wobei allerdings höhere Dosen erforderlich waren, als sie in PDL gefunden wurden. Da in der klinischen PD-Situation jedoch die Peritonealzellen chronisch, d.h. über lange Zeiträume diesen niedrigeren GDP-Konzentrationen ausgesetzt sind, entwickelten Witowski et al. [62] ein Langzeitinkubationsmodell bis zu 36 Tagen. Während dieses Zeitraumes wurden die Zellen wiederholt den GDP in solchen Konzentrationen ausgesetzt, die auch in herkömmlichen Peritonealdialyselösungen gefunden werden. Dabei wurde die Fähigkeit der HPMC, Zytokine (IL-6) und extrazelluläre Matrix (Fibronectin) zu sezernieren, sowie zusätzlich die Zellvitalität, Morphologie und Proliferation untersucht. Die Inkubation der Zellen mit den GDP führte zu einer signifikanten Reduktion des von den HPMC gebildeten IL-6 und

Fibronectin. Dabei wurden mehr als 80% der Veränderungen dieser Parameter während der ersten 12 Tage beobachtet. Gleichzeitig kam es zu einem Vitalitätsverlust und einer morphologischen Veränderung der Zellen. Nach 36 Tagen Inkubationsdauer war die Anzahl der Zellen, die mit den GDP behandelt wurden, um nahezu 60% reduziert. Es konnte jedoch eine Erholung und Normalisierung ihrer Proliferationskapazität nach Überführung in ein GDP-freies Kulturmedium beobachtet werden, so dass die GDP-induzierten Funktionsstörungen offenbar reversibel sind [62].

AGE-Bildung durch Peritonealdialyselösungen

In vivo sind die Glukosedegradationsprodukte reaktive Vorstufen zur Bildung von glykosilierten Proteinen, den sogenannten advanced glycation end products (AGE). Diese entstehen aus der Maillard-Reaktion, bei der die Carbonylgruppen der offenkettigen Glukose mit einer Aminogruppe des Proteins reagieren und so eine instabile und reversible Schiffbase bilden. Aus diesem Zwischenprodukt kann nach Amadori-Neuanordnung ein stabiles Ketoamin, das sogenannte Amadoriprodukt, entstehen [63]. Diese Reaktion erreicht ein Equilibrium nach ca. 28 Tagen [63]. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten kann das Amadori-Produkt einer Vielzahl von chemischen Reaktionen unterliegen und so die advanced glycation end products (AGE) bilden, die irreversibel an das Protein gebunden sind [63]. AGE werden ihrerseits als eigenständiger Bioinkompatibilitätsfaktor angesehen. Nakayama et al. [64] konnten das Vorhandensein von AGE im menschlichen Peritoneum von CAPD-Patienten in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit der CAPD nachweisen: Je länger (Monate bis Jahre) ein Patient den glukosehaltigen PDL ausgesetzt war, desto mehr AGE ließen sich nachweisen. Dabei sind AGE eine mögliche Ursache für die im Laufe der Behandlungsjahre bei CAPD-Patienten nachzuweisende Zunahme der Permeabilität der Peritonealmembran. AGE scheinen neben GDP und Glukose einen positiven Einfluss auf die Bildung von vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) zu haben [65,66,66,67,68]. Von VEGF ist bekannt, dass es die Gefäßrekrutierung und -neubildung fördert, was wiederum zur Erhöhung des Transportes über die Peritonealmembran führt. Das osmotische Agens wird verstärkt „absorbiert“, damit kommt es zur Verminderung oder sogar zum Verlust der Ultrafiltrationskapazität der Peritonealmembran.

Alternative glukosehaltige Peritonealdialyselösungen: Verwendung verschiedener Puffer, neutrale pH-Werte und Reduktion von Glukosedegradationsprodukten

Alternative glukosehaltige PD-Lösungen verschiedener Hersteller (Tabelle 3) befinden sich derzeit in der klinischen Einführung.

Tabelle 3: Alternative glukosehaltige PDL führender Hersteller

Produktname	Firma	Zusammensetzung
Balance	Fresenius, Deutschland	pH 7.4, Puffer: Laktat 35mmol/l, Glukose 1.5% bzw. 4.25%
BicaVera	Fresenius, Deutschland	pH 7.4, Puffer: Bikarbonat 35mmol/l, Glukose 1.5% bzw. 4.25%
Gambrosol Trio	Gambro, Schweden	pH 5.5-6.5, Puffer: Laktat 39-41mmol/l, Glukose 1.5%, 2.5% bzw. 3.9%
Physioneal	Baxter, USA	pH 7.4, Puffer: Laktat 15mmol/l und Bikarbonat 25mmol/l, Glukose 1.36%, 2.27% bzw. 3.86%

Ziel ist, eine PDL zu entwickeln, die möglichst pH-neutral ist, wenige GDP enthält und dabei gleichzeitig kostengünstig produziert werden kann. Dies ist mit einigen technischen Schwierigkeiten verbunden. Möchte man den pH-Wert in der Lösung neutral halten, um dessen negative Eigenschaften auf die Peritonealmembran, wie z.B. die intrazelluläre Azidifizierung durch Laktat, zu verhindern, so bleibt einem zunächst nur die Möglichkeit, die Filtersterilisierung zu verwenden, um eine starke Degradierung der Glukose, die zum Karamelisieren der Lösung führt, zu verhindern. Dieses Verfahren ist wegen der sehr hohen Produktionskosten und des aufwendigen Zulassungsverfahrens für die Massenanwendung nicht praktikabel. Bei der Entwicklung von PDL wurde daher ein Umweg zunutze gemacht, der nicht nur die Verwendung einer pH-neutralen Lösung ermöglicht, sondern gleichzeitig die Entstehung von GDP minimiert. Sterilisiert man Glukose bei sehr niedrigem pH-Wert und in relativ hoher Konzentration, so wird die Entstehung von GDP auf ein Minimum reduziert. Dabei sollte gleichzeitig die Anwesenheit von katalysierenden Substanzen vermieden werden [45]. Eine Lösung für dieses Problem ist die Verwendung von sogenannten Doppelkammerbeuteln: Darin wird Glukose zusammen mit den Elektrolyten getrennt vom Puffersystem bei sehr niedrigem pH-Wert sterilisiert. Der Puffer befindet sich in einem zweiten Kompartiment bei einem hohen pH-Wert. Kurz vor Verwendung der Lösung mischt

der Patient die Kompartimente durch Druck auf eine Trennmembran, und die resultierende Lösung ist nahezu pH-neutral. Ein Beispiel für eine solche Lösung ist die in dieser Arbeit verwendete Balance-Lösung (Abbildung 2).

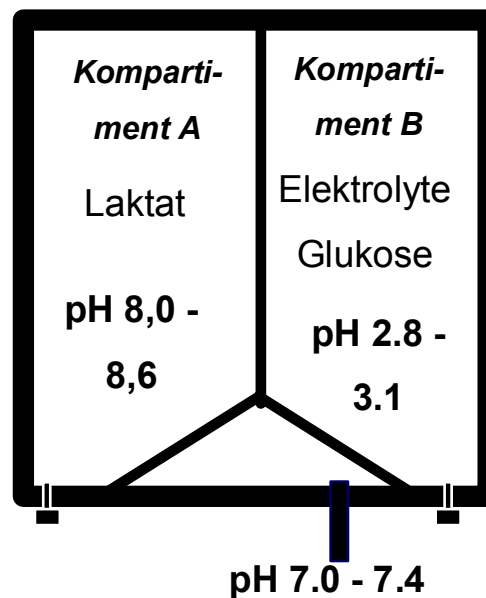


Abbildung 2: Beispiel einer zweikammrigen Peritonealdialyselösung Balance (Fresenius)

Dabei wird durch die Verwendung dieser Systeme nicht nur die Entstehung von GDP während der Produktion, sondern auch für die Dauer der Lagerung vermindert. Da es in konzentrierten wässrigen Lösungen normalerweise zur spontanen Degradation von Glukose kommt, kann nämlich auch hier durch Lagerung der Glukose in hoher Konzentration bei niedrigem pH-Wert ein Teil der Degradation verhindert werden. Bei der Verwendung von Doppelkammersystemen ist auch eine Variation des verwendeten Puffersystems möglich. So ist die Verwendung von Bikarbonat als Puffer möglich, bei der es bei Benutzung von herkömmlichen Einkammersystemen zu technischen Schwierigkeiten kommt [69]. Diese resultieren daraus, dass es bei Verwendung hoher Bikarbonatkonzentrationen, die notwendig sind, um die metabolische Azidose bei Niereninsuffizienz zu korrigieren, zur Präzipitierung von Calciumcarbonat kommt. Dabei sind bei der Verwendung von Bikarbonat als Puffer allerdings zusätzliche Ansprüche an die verwendeten Plastikmaterialien zu stellen, um ein

Entweichen von Kohlendioxid, das bei der Verwendung von Bikarbonat entsteht, aus dem Beutel zu verhindern.

Die akuten Effekte, die eine neutrale und bikarbonatgepufferte PDL im Vergleich zu einer sauren und laktatgepufferten PDL auf HPMC haben, wurde vor einigen Jahren von Jörres et al. untersucht [41]. So fanden sie eine dosis- als auch zeitabhängig verbesserte Funktion, ausgedrückt durch die stimulierte IL-6-Produktion von HPMC und humanen peritonealen Fibroblasten (HPFB), nach Inkubation mit der pH-neutralen, bikarbonatgepufferten PDL. Im Vordergrund für die verbesserte Biokompatibilität der bikarbonatgepufferten Doppelkammer-PDL bei der Durchführung dieser Akutexperimente steht aber hier, wie auch in der Diskussion von Jörres et al. [41] ausführlich beschrieben, vermutlich vielmehr der pH-Wert und - wie inzwischen bekannt ist - der niedrigere Gehalt an GDP in der Doppelkammer-PDL als die Veränderung des Puffersystems.

Als ein weiteres mögliches Puffersystem in glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen ist die Verwendung von Pyruvat möglich. Brunkhorst et. al. [70] untersuchten in ihrer 1995 erschienenen Arbeit die Verwendung von Pyruvat im Vergleich zu Laktat (je 35 mmol/l) als Puffer in glukosehaltigen PDL (G1.36% versus G3.86%, pH5.5) in ihrer Wirkung auf Proliferation und IL-1ra Produktion von HPMC. Dabei fanden sie eine im Vergleich zur laktatgepufferten PDL signifikant verbesserte Proliferation (niedrige und hohe Glukosekonzentration) und Synthesefunktion in Form einer signifikant erhöhten IL-1ra Ausschüttung (hohe Glukosekonzentration) der pyruvatgepufferten PDL. Brunkhorst et al. vermuten, dass die Laktatoxidation in HPMC durch den hohen Glukoseanteil in den PDL blockiert ist („Crabtree-Effekt“) und damit die Energiegewinnung durch die Glykolyse beeinträchtigt wird. Bei pyruvathaltigen PDL hingegen dient Pyruvat, welches nicht durch die blockierte Laktatoxidation beeinflusst wird, als alternative Energiequelle und schützt so möglicherweise die HPMC-Proliferation, Integrität und Funktion.

Shostak et al. [71] wiesen eine signifikant verbesserte Vitalität von mit Wasserstoffperoxid behandelten Rattenmesothelzellen nach Koinkubation mit Pyruvat nach: Sie inkubierten von Ratten gewonnene peritoneale Mesothelzellen mit 2mM Hydrogenperoxid, dessen Freisetzung durch Mesothelzellen in Anwesenheit von hochprozentiger Glukose signifikant erhöht ist, mit und ohne 2 mM Pyruvat und fanden im MTT-Vitalitätstest eine signifikant verminderte Vitalität der Zellen, die nur mit Wasserstoffperoxid (ohne zusätzliches Pyruvat) behandelt wurden. Die Vitalität der Zellen, die zusätzlich mit Pyruvat behandelt wurden, war im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) erhalten. Den protektiven Effekt von Pyruvat führen sie dabei auf seine Eigenschaften als Radikalfänger zurück.

1.2.2.4.2 Alternative osmotische Agenzien:

Seit die Probleme (s.o.), die Glukose insbesondere mit Laktat als Puffer mit sich bringt, bekannt sind, wird an alternativen osmotischen Agenzien gearbeitet. Seit kürzerer Zeit sind nun alternative Peritonealdialyselösungen mit Aminosäuren oder Icodextrin als osmotische Agenzien verfügbar, und erste Biokompatibilitätstests in vivo und in vitro, die unter anderem Thema dieser Arbeit sind, wurden durchgeführt und veröffentlicht.

Aminosäurenhaltige PDL:

Die Entwicklung einer aminosäurehaltigen PDL diente primär nicht dem Austausch des osmotischen Agens, sondern dem Ersatz von körpereigenen Aminosäuren, die während der Peritonealdialysebehandlung über das Bauchfell verloren gehen. Man versprach sich eine Verbesserung der negativen metabolischen Effekte, die Glukose mit sich bringt, wie Hyperdyslipidämie, Übergewicht und den Verlust von Aminosäuren mit daraus resultierender Malnutrition. Außerdem hoffte man durch die Verwendung eines alternativen Agens auf eine günstige Wirkung auf die peritonealen Zellen und damit auf einen längeren Erhalt des Peritoneum als Dialysemembran.

So konnten Hanning et al. [72] metabolische Vorteile von laktatgepufferter Aminosäuren-PDL (1.1% und 2.0% Travasol, Baxter) versus laktatgepufferter Glukose-PDL (2.5% und 4.25% Dianeal, Baxter) bei vergleichbarer Kreatinin- und Harnstoffclearance bei Kindern nachweisen. Im Vergleich zur Glukoselösung wurden mit der Aminosäuren-PDL die Verluste an Aminosäuren und Proteinen ins Effluat unter Beibehaltung von Euglykämie mehr als kompensiert. In dieser Studie konnte dies allerdings nur für den jeweiligen Beutelwechsel und nicht über längere Zeit gezeigt werden. Die Wasser-, die Kreatinin- und Harnstoffclearance war mit den aminosäurehaltigen PDL leicht vermindert. Young et al. [73] beschrieben später in einer Langzeitstudie über 16 Wochen die Vorteile einer auf Aminosäuren basierenden CAPD-Lösung (Baxter 151) bezüglich der nutritiven Effekte im Vergleich zu einer herkömmlichen auf Glukose basierenden CAPD-Lösung (hier: Dianeal 137, Baxter): 85% der Aminosäuren der alternativen PDL wurden innerhalb von 6 Stunden absorbiert. Dabei war am Ende des Austauschzyklus mit dieser Lösung die Konzentration der Plasmaamino-säuren signifikant höher als beim Austausch mit der glukosehaltigen PDL. Obwohl der Verlust von Aminosäuren ins Dialysat und den Urin mit der Aminosäuren-PDL innerhalb der 12 Wochen Studiendauer aufgrund einer reversiblen makromolekularen Leckage langsam anstieg, war die Aufnahme von Aminosäuren (aus dem morgentlichen Wechsel mit der Aminosäuren-PDL)

insgesamt gesehen höher. Andere Untersucher konnten später in ähnlichen Studien [74,75] die metabolischen Vorteile von Aminosäuren-PDL bestätigen. Parallel wurden von einigen Autoren [75,76,77] auf negative Eigenschaften von Aminosäuren-PDL aufmerksam gemacht: So können Aminosäuren-PDL das Risiko für eine Hyperhomocysteinämie und damit vermutlich auch das Atheroskleroserisiko bei Peritonealdialysepatienten erhöhen [75]. Den Mechanismus erklären sich die Autoren wie folgt: Nach der Absorption der Aminosäure Methionin aus der aminosäurehaltigen PDL kommt es zu deren teilweiser Konvertierung in S-Adenosylmethionin, welches ein Methyl donor bei verschiedenen Transmethylierungsreaktionen ist, die auch zur Bildung von S-Adenosylhomocystein und schließlich Homocystein führen. Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz können aus noch ungeklärten Ursachen Homocystein nur eingeschränkt metabolisieren. Damit kann es zur Hyperhomocysteinämie kommen, welche ein unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose ist. Brulez et al. [75] fand erhöhte Homocysteinspiegel bei Patienten, die mit einer 1.1% Aminosäuren-PDL behandelt wurden, wobei angemerkt werden muss, dass die dort verwendete PDL von Baxter wesentlich mehr Methionin (5.7 mmol/l) als die von uns getestete PDL Aminobic von Fresenius (Methionin: 2.681 mmol/l) enthält. Aminosäuren sind in ihrer osmotischen Effizienz limitiert und können durch den erhöhten Stickstoffanfall durch die absorbierten Aminosäuren zu erhöhten Harnstoffkonzentrationen führen, wobei Brulez et al. [75] keinen Einfluss auf die (durch das wöchentliche Kt/V ausgedrückte) Dialyseeffizienz finden konnten. Des Weiteren sind Aminosäuren-PDL in ihrer klinischen Toleranz für den Patienten begrenzt und erhöhen die Azidosegefahr [77]: Die Bildung von Wasserstoffionen durch Metabolisation von Lysin, Arginin und Methionin kann dabei zur Azidose führen. Durch Reduktion der genannten Aminosäuren konnten Jones et al. [76] in der Probandengruppe, die den Wechsel mit veränderter Aminosäuren-PDL durchführten, eine Erhöhung des Serumbikarbonats im Vergleich zur Gruppe, die unveränderte Aminosäuren-PDL („konventionelle Zusammensetzung“) erhielten, nachweisen. Zusammengefasst ist die Verwendung aminosäurehaltiger PDL aufgrund der beschriebenen Problematik nur bis zu einem Beutelwechsel pro Tag möglich.

Icodextrinhaltige PDL:

Parallel zu der Entwicklung von Aminosäuren-PDL wurden Polyglucose-PDL, die Icodextrin als osmotisches Agens enthalten, entwickelt. Icodextrin ist eine 7.5%ige Glukosepolymerlösung mit einer mittleren Kettenlänge des Polymers von 4-250 Glukoseeinheiten und einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 16200 Dalton. Das Prinzip dieser isoosmolaren Lösung beruht darauf, dass man die im Vergleich zum urämischen Plasma großen Polymere zur Herstellung eines kolloidosmotischen Gradienten nutzt. Diese Peritonealdialyselösung hat daher die folgenden Vorteile: Sie ist isoosmolar mit dem urämischen Serum und verhindert damit Schädigungen der Peritonealmembran, die mit der hohen Osmolalität verbunden sind. Sie ermöglicht Ultrafiltration über lange Austauschperioden von 8-12 Stunden für CAPD [78] und von bis zu 16 Stunden für automatische Peritonealdialyse (APD) [79]. Sie ermöglicht weiterhin eine erhöhte Ultrafiltration und Clearance im Vergleich zu 2.27% Glukose-PDL beim Tageswechsel mit icodextrinhaltiger PDL bei APD-Patienten, ohne das Peritoneum einer hypertonen Lösung auszusetzen [80]. Sie weist metabolische Vorteile im Vergleich zu Glukose-PDL, wie reduzierte Kalorienaufnahme pro Mililiter Ultrafiltration und minimale oder fehlende Insulinantwort, auf [77]. Icodextrin wird vom Peritoneum wie andere große Moleküle (z.B. Albumin) viel weniger absorbiert als Glukose (Die Absorption von Icodextrin passiert eher kontinuierlich über die Lymphgefäße, als über das Peritoneum.) [81], und sie hat Vorteile bei Peritonitis bezüglich Ultrafiltration im Vergleich zu Glukose-PDL: Nach Untersuchungen von Wang et al. [82] an Ratten war die peritoneale Ultrafiltration mit Icodextrin in der Gruppe der Tiere mit artifiziell erzeugter Peritonitis höher als in der Kontrollgruppe der Ratten ohne Peritonitis. Im Vergleich dazu war die peritoneale Ultrafiltration in der Gruppe der mit Glukose-PDL behandelten Ratten mit Peritonitis geringer als bei den Ratten ohne Peritonitis. Die verminderte Ultrafiltration bei Versuchstieren bzw. Patienten mit Peritonitis, die mit Glukose-PDL behandelt werden, erklärt sich daraus, dass während einer Peritonitis Glukose vermehrt peritoneal absorbiert wird und es so zur verminderten transkapillären Ultrafiltrationsrate und damit verminderter peritonealer Flüssigkeitsentfernung kommt. Gleichzeitig wird bei Peritonitis aufgrund von erhöhter hydraulischer Gewebeporosität auch direkt vermehrt peritoneale Flüssigkeit absorbiert. Hingegen erhöht sich die peritoneale Absorption bei Benutzung von Icodextrin während einer Peritonitis nicht signifikant [82]. Trotz allem kam es bei den mit Icodextrin behandelten Tieren mit Peritonitis zur erhöhten Ultrafiltration im Vergleich zu den Tieren ohne Peritonitis. Als Erklärung dafür vermuten die

Autoren, dass die erhöhte peritoneale Ultrafiltration im Zusammenhang mit der durch die während einer Peritonitis erhöhte Amylaseaktivität steht, die zur Degradation von Icodextrin führt. Dies wiederum erhöht die Dialysat osmolalität und bedingt eine erhöhte Ultrafiltration. Im Vergleich zum Menschen muss einschränkend bemerkt werden, dass Ratten über wesentlich mehr Amylase verfügen und daher als Tiermodell für die Verwendung von Icodextrin schlecht geeignet sind.

Trotz all dieser Vorteile, die icodextrinhaltige Peritonealdialyselösungen haben, gibt es einige Nachteile, über dessen Konsequenzen es noch keine ausreichenden Erfahrungen gibt. So sind allergische Reaktionen unterschiedlichster Schweregrade bekannt, welche sich überwiegend an der Haut manifestieren [83]. Des Weiteren kommt es zur teilweisen Absorption des Glucosepolymers, welcher dann durch Amylase in Oligosaccharide und zum Disaccharid Maltose hydrolysiert wird. Da die weitere Metabolisation von Maltose aufgrund fehlender zirkulierender Maltaseaktivität im menschlichen Kreislaufsystem eingeschränkt ist, kommt es zu erhöhten Maltose- und Maltotrioseplasmaspiegeln. Zwar findet man Maltase in verschiedensten extraintestinalen Geweben, wie auch in der Niere, doch kommt es dennoch bei Niereninsuffizienz zur Maltoseakkumulation [78], die während CAPD jedoch zwei Wochen nach Therapiebeginn durch kontinuierliche Peritonealclearance von 3 ml/min ein „steady state“ erreicht [81]. Intrazellulär ist genügend Maltase in den intrazellulären Lysosomen enthalten, so dass intrazelluläre Maltose schnell metabolisiert wird [81]. Als weiterer Nachteil kommt hinzu, dass Polyglukoselösungen für kurze CAPD-Wechsel wegen der limitierten osmotischen Effizienz nicht sinnvoll eingesetzt werden können. Außerdem wird eine Blockierung des retikuloendothelialen Systems durch dextrinhaltige PDL diskutiert [77].

Auch Icodextrinlösungen sind in der Lage Proteine zu glykosilieren und damit AGEs zu bilden. Im Vergleich zu Glukose-Standardlösungen mit 1.5%igem Glukoseanteil ist der Anteil an gebildeten AGE für 7.5%ige Icodextrinlösung allerdings 10fach geringer [63], so dass in dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen wird. Weitere mögliche Nachteile der icodextrinhaltigen Lösung werden im Diskussionsteil besprochen.

2 Fragestellung

Die Peritonealdialyse ist in den letzten Jahrzehnten zu einem effektiven Nierenersatzverfahren bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz herangereift. Doch seit Beginn der Peritonealdialyse sind mehr oder weniger dieselben Peritonealdialyselösungen in Gebrauch. Diese haben aufgrund ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften, wie niedriger pH-Wert, hohe Osmolalität und Toxizität durch Glukose und dessen Degradationsprodukte mit konsekutiver AGE-Bildung einen negativen Einfluss auf den Langzeiterhalt des Peritoneum und dessen Fähigkeit, sich immunologisch mit fremden Erregern auseinanderzusetzen. Seit einigen Jahren wird an der Entwicklung modifizierter, auf Glukose basierender PDL und PDL mit alternativen osmotischen Agenzien, wie Icodextrin und Aminosäuren gearbeitet, bislang ist aber keine der neuen Lösungen weltweit für die klinische Anwendung zugelassen.

Die zentralen Fragen der Arbeit waren die folgenden:

- Welche akuten und chronischen Wirkungen haben herkömmliche Glukose-PDL im Vergleich zu modifizierten auf Glukose basierenden PDL auf HPMC im Zellkulturmodell?
- Wie verhalten sich HPMC nach Inkubation mit den alternativen osmotischen Agenzien Icodextrin und Aminosäuren?

Im akuten Modell wurden die Zellen den Lösungen unterschiedlich lange (ein und vier Stunden) ausgesetzt und dann für 24 Stunden in ein Ruhemedium überführt. Damit lassen sich die akut toxischen Effekte der Lösungen bezüglich Vitalitäts- und Synthesefunktionsminderung miteinander vergleichen. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen einem Mix aus gleichen Teilen Lösung und Zellkulturmedium chronisch, d.h. für bis zu zehn Tage, repetitiv ausgesetzt. Dadurch war es möglich sich den in-vivo-Verhältnissen anzunähern, bei denen das Peritoneum über lange Zeit (Monate und Jahre) immer wieder den Lösungen ausgesetzt ist. Wie bereits in der Einleitung näher erläutert, scheinen insbesondere die Glukosedegradationsprodukte eher einen chronisch toxischen Effekt zu haben, der in bisherigen (Akut-)Modellen unterschätzt wurde. Um das Peritoneum zu schützen und damit auch eine lange Nierenersatztherapie mittels Peritonealdialyse zu ermöglichen, war es dringend erforderlich, die wesentlichen toxischen Effekte der herkömmlichen als auch der alternativen Peritonealdialyselösungen zu analysieren, um damit neue Therapiestrategien zu entwickeln bzw. bereits entwickelte in ihrer Toxizität zu überprüfen, um damit auf Grundlage der Daten das Risiko einer klinischen Anwendung zu minimieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die Zellkulturflaschen und sonstigen Zellkulturplastikmaterialien waren von Falcon (Lincoln Park, NJ, USA). Als Zellkulturmedium für die Mesothelzellen diente M199 (ICN/Flow, Meckenheim, Deutschland). Diesem wurde L-Glutamin (2 mmol/l) (Biochrom KG, Berlin, Deutschland), Insulin (0.5 µg/ml), Transferrin (0.5 µg/ml), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Hydrocortison (40 µg/ml) zugesetzt. Vor Gebrauch des Zellkulturmediums wurde diesem bis zu 10% fetales Kälberserum (FKS) (Gibco BRL, Berlin, Deutschland) hinzugefügt, das für alle Experimente dieser Arbeit derselben Charge entstammte. Die Trypsin/EDTA-Lösung (0.05%/0.025% in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++}) und das PBS kamen von der Firma Biochrom KG (Berlin, Deutschland). Die Peritonealdialyselösungen CAPD2/3, Balance low/high und Aminobic bezogen wir von der Firma Fresenius Medical Care (Bad Homburg, Deutschland) und die PDL Extraneal (Icodextrin 7.5%) bezogen wir von der Firma Baxter (Illinois, USA). Für die Untersuchung der Wirkung von hitzesterilisierten versus filtersterilisierten PDL wurden die Testlösungen analog der Rezeptur für CAPD2/3 im Labor hergestellt. Ein Teil der Lösungen wurde wie die kommerziell erhältlichen hitzesterilisiert (H) und der andere Teil filtersterilisiert (F). Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tabelle 4 angegeben. Die Hitzesterilisation der im Labor hergestellten glukosehaltigen und hitzesterilisierten PDL erfolgte für 20 Minuten bei 121°C und einem Druck von 0.2MPa. Die Filtersterilisation der parallelen Testlösungen erfolgte mittels Filtration durch einen Filter mit einer Porengröße von 0.2[Tab1]µm (Nalgene, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA).

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilem Procedere im Lamina-Air-Flow durchgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Testlösungen

	<i>CAPD2 (PD2K)+</i>	<i>CAPD3 (PD3K) +</i>	<i>Extraneal (Icodextrin 7.5%)</i>
Na ⁺ (mmol/l)	134	134	133
Cl ⁻ (mmol/l)	103.5	103.5	97
Ca ⁺⁺ (mmol/l)	1.75	1.75	1.75
Mg ⁺⁺ (mmol/l)	0.5	0.5	0.25
Laktat (mmol/l)	35	35	40
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	-	-	-
Glukose (g/l)	15	42.5	-
Glukosepolymer (g/l)	-	-	75
Aminosäuren* (g/l)	-	-	-
pH	5.2-5.5#	5.2-5.5#	5.5#
Osmolalität (mosmol/kg)	358	511	285

	<i>Balance low</i>	<i>Balance high</i>	<i>Aminobic</i>
Na ⁺ (mmol/l)	134	134	137
Cl ⁻ (mmol/l)	103.5	103.5	103.5
Ca ⁺⁺ (mmol/l)	1.75	1.75	1.25
Mg ⁺⁺ (mmol/l)	0.5	0.5	0.5
Laktat (mmol/l)	35	35	-
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	-	-	34
Glukose (g/L)	15	42.5	-
Aminosäuren* (g/L)	-	-	10
pH	7.2-7.6	7.2-7.6	7.2-7.6
Osmolalität (mosmol/kg)	358	511	369

+ Die im Labor hergestellten und hitze- bzw. filtersterilisierten PDL heißen im Text/Abb. PD2H bzw. PD2F.

Diese PDL wurden vor Versuchsbeginn mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt.

* Aminosäurenkomponenten von Aminobic:

Essentielle Aminosäuren		Nicht-essentielle Aminosäuren:	
L-Histidin	3.222 mmol/l	L-Alanin	6.73 mmol/l
L-Isoleucin	5.72 mmol/l	L-Arginin	2.698 mmol/l
L-Leucin	8.61 mmol/l	L-Glycin	5.99 mmol/l
L-Lysin	7.18 mmol/l	Prolin	3.91 mmol/l
L-Methionin	2.681 mmol/l	L-Serin	4.76 mmol/l
L-Phenylalanin	3.33 mmol/l	L-Taurin	0.799 mmol/l
L-Threonin	7.05 mmol/l	L-Tyrosin	0.552 mmol/l
L-Tryptophan	2.01 mmol/l		
L-Valin	14.51 mmol/l		

3.2 Peritoneale Zellkultur:

3.2.1 Präparation von humanem Omentum Majus und Gewinnung von humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC):

Humane peritoneale Mesothelzellen (HPMC) wurden, wie von Stylianou et al. [28] beschrieben, gewonnen: Etwa 10-20 cm³ große Anteile von OP-Präparaten des humanen Omentum Majus von Patienten, die sich einem elektiven abdominalchirurgischen Eingriff unterzogen, dienten als Ausgangsmaterial. Diese wurden dreimal in phosphatgepufferter Lösung (PBS, Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen und in 15 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/ 0,025%) für 20 Minuten bei 37°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Die resultierende Suspension wurde dann für 5 Minuten bei 4°C und 180*g zentrifugiert. Das verbleibende Gewebe und die Trypsin/EDTA-Lösung wurden zurückgewonnen und das Pellet zweimal in Zellkulturmedium, das zur Inhibition der Trypsinaktivität 10% FKS enthielt, gewaschen und jeweils bei 180*g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Trypsin/EDTA-Andauung wurde noch einmal für 20 Minuten wiederholt. Das jeweils verbleibende und gewaschene Pellet wurde in 5 ml Zellkulturlösung mit 10% FKS resuspendiert und in 25 cm²

große Zellkulturflaschen überführt. Diese enzymatische Lösung der Zellen aus dem Omentum Majus erzeugte in den ersten 20 Minuten ein homogenes und in den zweiten 20 Minuten noch ein nahezu homogenes zum Teil aber bereits mit Fibroblasten vermisches Mesothelzellbild. Die gewonnenen Mesothelzellen wurden für 24 Stunden in angefeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂/95% Luft und bei 37°C in M199-Medium mit 10% FKS kultiviert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel. Weitere Wechsel des Nährmediums erfolgten jeden dritten Tag, bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Kontrolliert wurde das Wachstum der Zellen im Lichtmikroskop.

Das Medium M199 enthielt als Zusätze: Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), L-Glutamin (2 mM), Insulin (0,5 µg/ml), Transferrin (0,5 µg/ml) und Hydrocortison (0,4 µg/ml).

3.2.2 Passagierung der konfluenten Zellen

Konfluente Zellen wurden nach Entfernung des Zellkulturmediums einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,025%) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurde im Lichtmikroskop kontrolliert. Dann wurden die Zellen zur Inhibition der Trypsinaktivität zweimal in FKS-haltigem (10%) Zellkulturmedium gewaschen, nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 180*g im Pellet resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:3 in neue Zellkulturflaschen überführt.

Für die Inkubationsexperimente mit humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC) wurden die Zellen nach Ablösung und zweimaliger Waschung in 24-Loch-Platten überführt. Nach konfluentem Wachstum der Zellen in den Platten wurden diese zweimal mit Zellkulturmedium ohne FKS gewaschen und für 48 Stunden in ein Ruhemedium überführt. Das Ruhemedium enthielt für die akuten Experimente 0.1%iges und für die chronischen Experimente 0.3%iges FKS. Frühere Experimente [28,29] haben gezeigt, dass unter diesen Kulturbedingungen HPMC für mehr als 72 Stunden überleben, aber nicht proliferieren. Für 0.3% FKS-haltiges Nährmedium, welches bei den chronischen Versuchen mit HPMC eingesetzt wurde, konnte ein nicht proliferatives Überleben der Zellen bis zu 36 Tagen gezeigt werden [62]. In Abbildung 3 erkennt man nach 36 Tagen eine deutliche Zunahme des Zellproteins der Zellen, die mit 10% FKS inkubiert wurden. Die dazugehörige Phasenkontrastmikroskopie zeigt HPMC, die sich nicht mehr als konfluenter Monolayer wie in der mittleren Abbildung darstellen, sondern sehr dichte Zellen, die teilweise bereits

übereinander gewachsen sind. Ohne FKS nimmt die Zellproteinmenge bis zum Tag 36 kontinuierlich ab und in der Phasenkontrastmikroskopie sind nur noch vereinzelte vitale Zellen erkennbar. Nur die HPMC, die mit 0.3% FKS behandelt wurden, zeigen bis zum Tag 36 einen gleichmäßigen Zellproteingehalt und einen konfluenten Monolayer in der Phasenkontrastmikroskopie. Für alle Experimente dieser Arbeit wurde die gleiche Anzahl an Zellen pro Loch benutzt. Die korrespondierende Menge an Zellprotein war für HPMC: $2.1 \pm 1.0 \cdot 10^3$ Zellen/ μg Zellprotein (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=16$ Zelllinien).

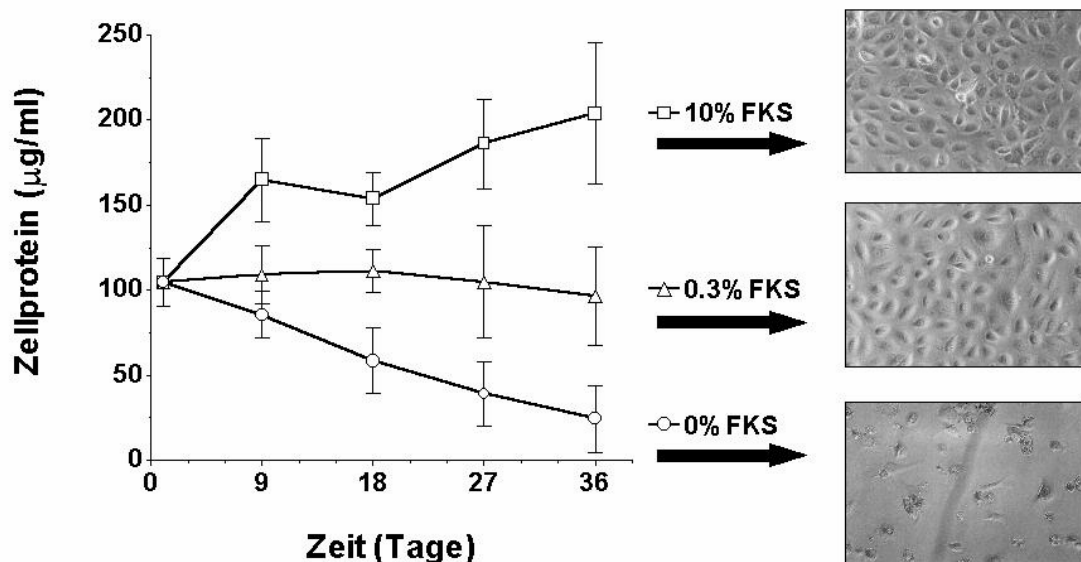


Abbildung 3: Einfluss unterschiedlicher FKS-Konzentrationen auf die Morphologie und den Zellproteingehalt von HPMC nach bis zu 36 Tagen.

3.2.3 Charakterisierung von humanen peritonealen Mesothelzellen (HPMC):

Die morphologische Identifizierung der peritonealen Mesothelzellen (HPMC) erfolgte in der Phasenkontrast-Mikroskopie. Die Kulturen wurden bei jedem Procedere zuvor auf Wachstum und Kontamination mit Bakterien oder Pilzen lichtmikroskopisch durchgesehen. Die HPMC (Beispiele von normalen konfluenten HPMC siehe in der Mitte der Abbildung 3) wurden als polygonale und bei Konfluenz in pflastersteinähnlicher Anordnung wachsende Zellen

identifiziert. Die weitere Charakterisierung der Zellen erfolgte - wie von Stylianou et al. [28] beschrieben - mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die verwendeten primären monoklonalen Antikörper waren:

Antikörper	Verdünnung
anti-Zytokeratin-18	1:800
anti-Vimentin	1:200
anti-Faktor VIII	1:50
anti-Desmin	1:50

Die primären Antikörper bezogen wir von Dako Ltd., Bucks, United Kingdom. Der sekundäre Antikörper war ein Kaninchen-anti-Maus-FITC-Konjugat (Sigma, Deisenhofen) – dieser wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

Zur Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Mesothelzellen in 8-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden) ausgesät, nach Erreichen der Konfluenz mit eiskaltem Methanol/Acetongemisch (1:1) für 10 Minuten fixiert und in PBS-Puffer mit 0.1% bovinem Serumalbumin gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 50µl des jeweiligen primären Antikörpers verdünnt in PBS/BSA und in einer feuchten Kammer für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschzyklus erfolgte anschließend die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (50µl der Verdünnung des Antikörpers in PBS/BSA) in ebenfalls feuchter Atmosphäre für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Jetzt erfolgte ein weiterer intensiver Waschzyklus, dem schließlich die Übertragung auf einen Objektträger (mittels Tris gepuffertem 10%Glycerol) und die Untersuchung unter UV-Licht folgte. HPMC sind positiv für Zytokeratin und Vimentin und negativ für Desmin und Faktor VIII.

3.2.4 Inkubationsexperimente mit Peritonealdialyselösungen (PDL)

Für alle Versuche wurden die zu testenden sauren PDL mittels NaOH auf einen pH-Wert um pH 7.4 eingestellt.

3.2.4.1 Glukose als osmotisches Agenz – alternativ sterilisierte Glukose-PDL im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Präinkubationsexperimente für ein und vier Stunden

HPMC Monolayer wurden in 24-Loch-Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend durch Inkubation (48h) in Ruhemedium (0.1% FKS) in ein nicht-proliferierendes Stadium überführt. Nach zwei Waschzyklen mit Ruhemedium wurden die

Zellen für ein und vier Stunden mit den zu testenden unverdünnten Peritonealdialyselösungen präinkubiert. Im Anschluss folgte der Austausch der PDL gegen das Kulturmedium und die Inkubation ohne und Inkubation mit Stimulation der Zellen mit 100 pg/ml IL-1 β für 24 Stunden. Nach den 24 Stunden wurden für die unstimulierten Zellen ein Vitalitätsassay (MTT-Assay) durchgeführt. Der Überstand der stimulierten Zellen wurde in ein frisches Probengefäß pipetiert und bis zur IL-6-Analyse mittels ELISA bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen selbst wurden mittels 0.1N NaOH-Lösung von dem Plastikmaterial gelöst und bis zur Proteinbestimmung bei -80°C eingefroren. Die Versuchsdurchführung erfolgte dabei gemäß Abbildung 4.

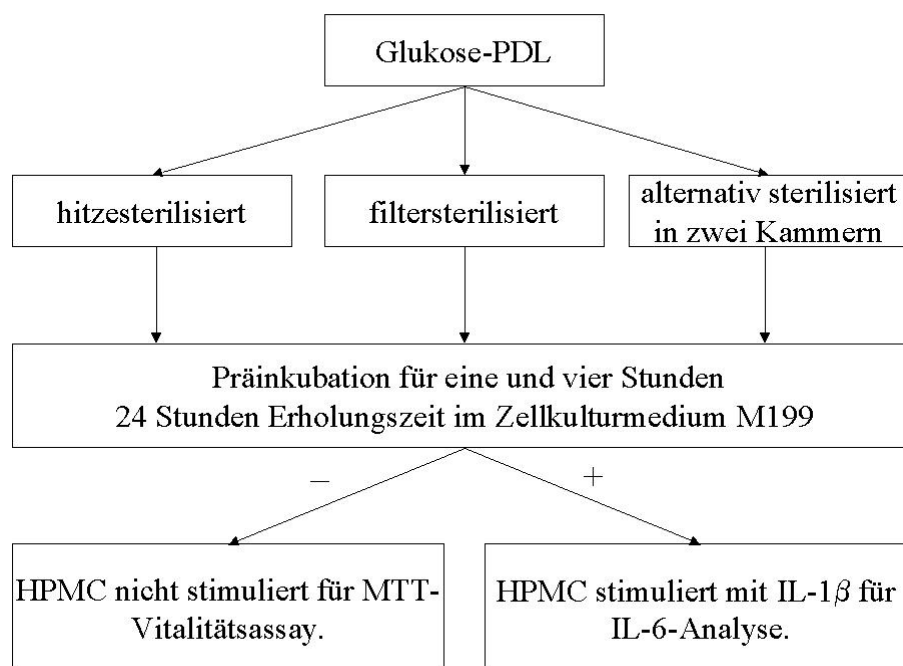


Abbildung 4: Versuchsanordnung für die Präinkubationsexperimente mit glukosehaltigen PDL.

3.2.4.2 Glukose als osmotisches Agens – alternativ sterilisierte Glukose-PDL im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Chronische Inkubation für bis zu zehn Tage

Konfluente, nicht proliferative HPMC (24-Loch-Platten) wurden für ein bis zehn Tage mit den zu testenden Peritonealdialyselösungen bei 37°C inkubiert. Die PDL wurden im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium gemischt, um die akute Toxizität der PDL zu mindern (pH-Wert zwischen 7.2 und 7.6 für alle PDL). Diese Mischung enthielt 0.3% FKS (Begründung siehe

oben) und wurde alle zwei bis drei Tage und dabei immer 24 Stunden vor dem zu untersuchenden Tag erneuert. Die letzten 24 Stunden vor Pipetieren des Überstandes wurden die Zellen zur Hälfte mit 1000pg/ml rekombinant hergestelltem IL-1 β stimuliert. Die andere Hälfte wurde ohne Stimulation inkubiert. Der Überstand der stimulierten Zellen wurde dann bei -80°C bis zur IL-6-Analyse mittels ELISA aufbewahrt. Dabei wurden die Zellen mittels 0.1N NaOH-Lösung von dem Plastikmaterial gelöst und bis zur Proteinbestimmung bei -80°C eingefroren. Mit den unstimulierten Zellen wurde 24 Stunden nach dem letzten Medium/PDL-Wechsel der MTT-Assay durchgeführt. Die untersuchten Tage waren: 1. Tag, 4. Tag, 7. Tag, und 10. Tag. Die Versuchsdurchführung erfolgte dabei gemäß Abbildung 5.

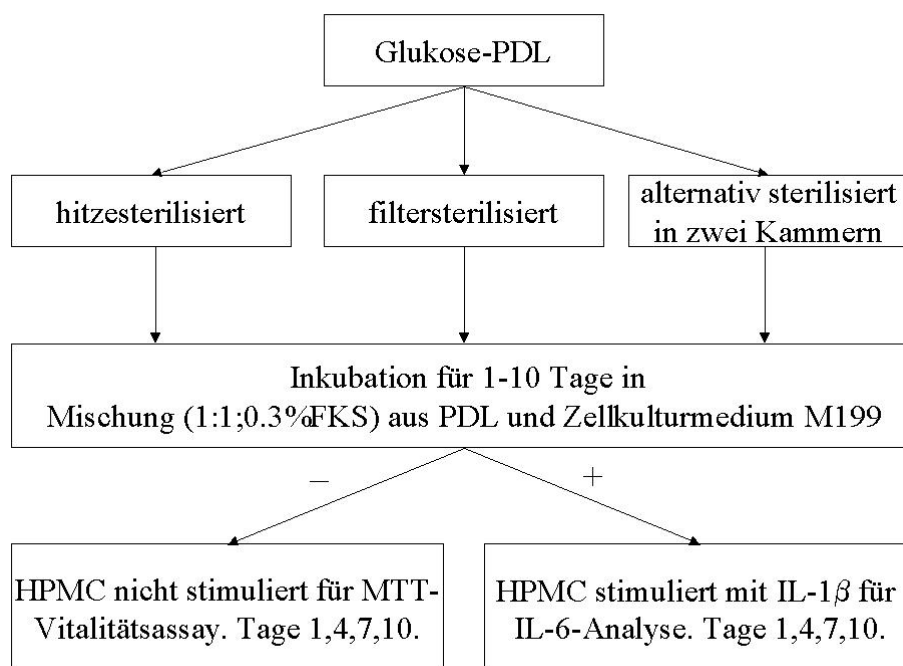


Abbildung 5: Versuchsanordnung für die chronischen Experimente mit glukosehaltigen PDL.

3.2.4.3 Alternative osmotische Agenzien im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Präinkubationsexperimente für 1 und 4 Stunden

Die Versuche wurden analog zu E2.4.1 durchgeführt. Bei den verwendeten PDL handelte es sich allerdings neben konventionellen hitzesterilisierten Glukose-PDL um PDL mit den alternativen osmotischen Agenzien Icodextrin (Extraneal) und Aminosäuren-PDL (Aminobic). Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 6 beschrieben.

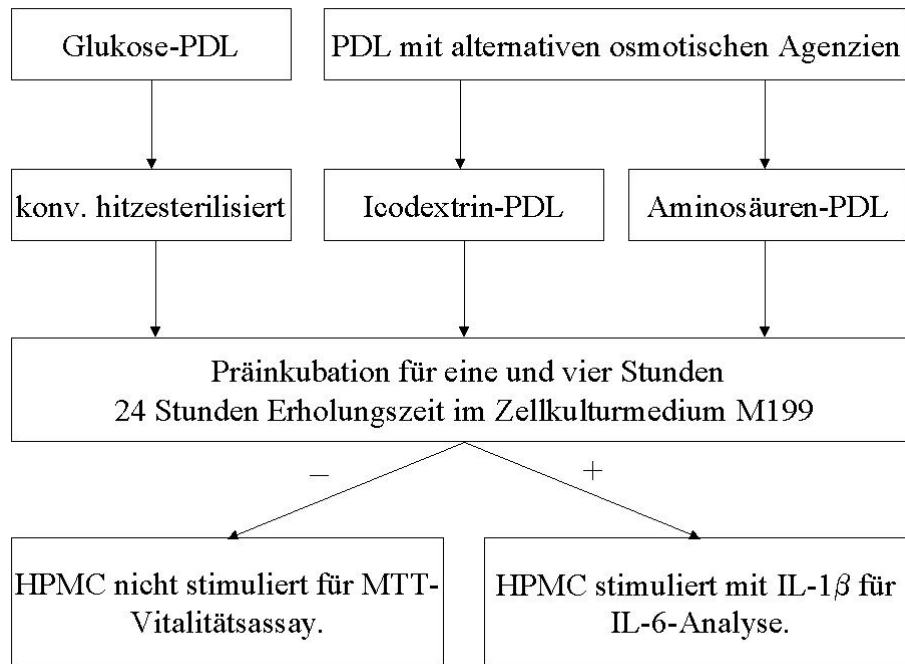


Abbildung 6: Versuchsanordnung für die Präinkubationsexperimente mit glukosehaltigen versus alternativen PDL.

3.2.4.4 Alternative osmotische Agenzien im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL – Chronische Inkubation für bis zu zehn Tage

Auch diese Versuche wurden analog zu der unter E2.4.2 beschriebenen chronischen Versuchsanordnung durchgeführt. Dabei wurden wiederum konventionelle hitzesterilisierte Glukose-PDL im Vergleich zu Extraneal und Aminobic verwendet. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 7 schematisiert.

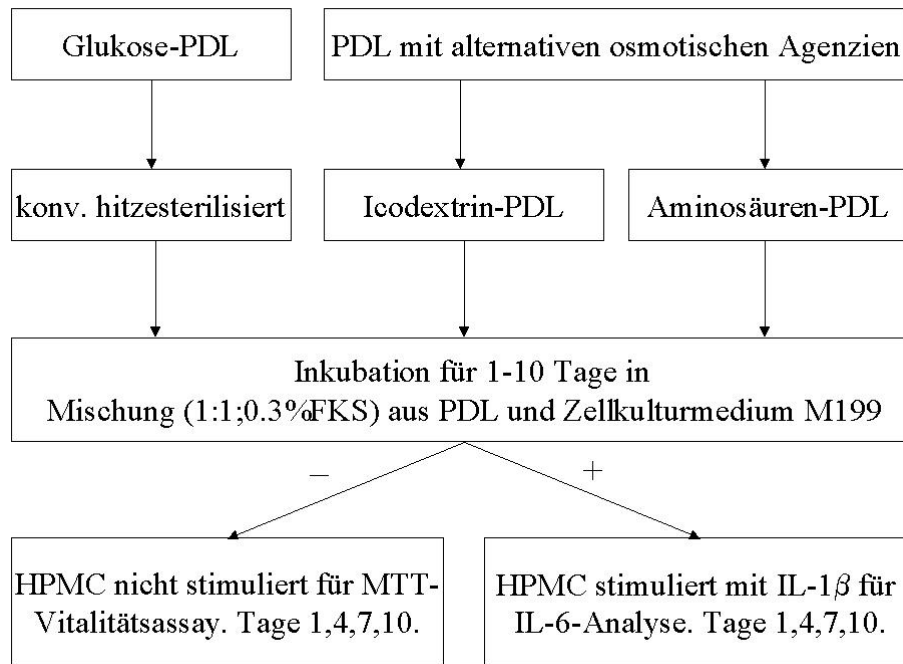


Abbildung 7: Versuchsanordnung für die chronischen Experimente mit glukosehaltigen versus alternativen PDL.

3.3 Enzymimmunoassay (ELISA) für Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) im Zellkulturüberstand von HPMC wurde mit Hilfe eines spezifischen Enzymimmunoassays quantifiziert [84]: Der Enzymimmunoassay wurde auf Microtiterstreifen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt, die mit einem polyklonalen anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Dakopatts, Hamburg, Deutschland) beschichtet wurden. Im Anschluss erfolgte die Beschichtung mit einem monoklonalem anti-IL-6-Antikörper von der Maus (Serva, Heidelberg, Deutschland). An diesem bindet das IL-6 in den Proben und Standards spezifisch. Die Menge des gebundenen IL-6 in den Proben und in den Standards wurde durch folgende Inkubationssequenz nachgewiesen:

1. ein polyklonaler anti-IL-6-Antikörper (Ziege) gekoppelt an Biotin (R&D Systems, Minneapolis, Min., USA);
2. Meerrettich-Peroxidase-Streptavidin (Calbiochem, Frankfurt, Deutschland) und
3. Tetramethyl-benzidin Substratpuffer für die Farbentwicklung (Fluka, Buchs, Schweiz).

Der IL-6-Gehalt in den Proben wurde nach einer Standardkurve berechnet, für die wir einen rekombinanten menschlichen IL-6-Standard (Janssen Beerse, Belgien) in Konzentrationen von 20 bis 2000 pg/ml verwendeten. Die untere Nachweisgrenze von IL-6 in den Proben lag bei 20 pg/ml. Das Fehlen von Kreuzreaktivität mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-2 , IL-3

oder IL-4 wurde mittels Zugabe dieser Zytokine zu leeren Proben in Konzentrationen über 50 ng/ml gezeigt. Rekombinante Zytokine wurden bezogen von British Biotechnology, Oxford, Großbritannien.

3.3.1 Herstellung des IL-6 Standards:

Für die Herstellung des IL-6-Standards wurde 10fach-PBS, die Stammlösung und der Assaypuffer benötigt und wie folgt angefertigt:

10fach PBS bestand aus 82.2 g/l Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 17.5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland) und wurde mit NaOH auf pH7.4 eingestellt.

Für die Stammlösung wurden 1 ml der Originallösung des Antikörpers mit 1 ml Ethylenglycol gemischt (Merck, Darmstadt, Deutschland) (IL-6 Konzentration: $1 \cdot 10^6$ pg/ml).

Der Assaypuffer bestand aus 10 ml des 10fach PBS, 50ml NaCl 0.9% (Merck, Darmstadt, Deutschland), 5 ml Lammserum (Gibco, Berlin, Deutschland), 50 µl Tween 20 und wurde mittels Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

Die einzelnen Standardwerte (2000 pg/ml, 200 pg/ml, 600 pg/ml, 60 pg/ml und 20 pg/ml) wurden dann durch entsprechende Verdünnung mit dem Assaypuffer erreicht.

3.3.2 Herstellung des polyklonalen Ziege-anti-human-IL-6-Antikörper gekoppelt an Biotin:

4 µl Biotin (5 mg in 1 ml Aqua bidest.) wurden in 100 µl anti-human IL-6 Antikörper gelöst und ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach ein bis zwei Tagen Lagerung bei 4°C erfolgte die Zugabe von 104 µl Ethylenglycol (1:50 verdünnt). Dieser gekoppelte Antikörper wurde bei -20°C gelagert und vor Gebrauch auf 1:500 in Tween 20 verdünnt.

3.3.3 Herstellung der TMB-Substratlösung:

Ein Teil der TMB(3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin)-Stammlösung (240 mg TMB [Fluka, Buchs, Schweiz] in 5 ml DMSO [Merck, Darmstadt, Deutschland] und 5 ml Ethanol) wurden unmittelbar vor Gebrauch mit 100 Teilen Gallati-Puffer gemischt. Dabei wurden für den Gallati-Puffer 8.4 g Zitronensäure [Merck, Darmstadt, Deutschland] in 160 ml Aqua bidest. gelöst und mit KOH [Merck, Darmstadt, Deutschland] auf einen pH von 3.95 eingestellt, dann mit Aqua bidest. auf 200 ml aufgefüllt und 68 µl 30% H_2O_2 (Aldrich) hinzugefügt.

3.3.4 Herstellung des Beschichtungspuffers

Zur Herstellung des Beschichtungspuffer wurden ein Teil 10fach PBS und neun Teile Aqua bidest. gemischt.

3.3.5 -Praktische Durchführung des ELISA für IL-6

Die Mikrotiterstreifen wurden zunächst mit polyklonalem Kaninchen anti-Maus-IgG (je 100 µL) (Antikörper 1:250 in Beschichtungspuffer verdünnt) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die einzelnen Löcher der Streifen je dreimal mit Waschpuffer (200 ml 10fach PBS + 1800 ml Aqua bidest. + 1 ml Tween 20) und einmal mit Aqua bidest. gewaschen. Dann wurden die Proben bzw. Standards mit je 50 µl in die Löcher pipetiert und nach Zugabe des monoklonalem Maus-anti-human-IL-6 Antikörper (1:200 in Assaypuffer) mit ebenfalls 50 µl pro Probe bzw. Standard unter gleichmäßiger Bewegung bei 30°C für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Stunde Inkubation bei 30°C unter ebenfalls kontinuierlicher Bewegung mit je 50µl Ziege-anti-Mensch-IL-6-Antikörper pro Probe bzw. Standard, der schließlich die Inkubation mit je 100 µl Streptavidin-Peroxidase (1:400 Verdünnung der Stammlösung [2.5µl Avidin und 22.5µl Assaypuffer] mit Assaypuffer) pro Probe bzw. Standard für weitere 30 Minuten unter gleichen Bedingungen (Bewegung bei 30°C) folgte. Dann wurden die Platten wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss restliche Flüssigkeit entfernt. Die Farbreaktion wurde durch 150 µl TMB pro Probe bzw. Standard initiiert und nach zehnminütiger Inkubation in Dunkelheit durch Zugabe von 50 µl 4N H₂SO₄ pro Probe bzw. Standard gestoppt. Jetzt konnte die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen und schließlich durch Berechnung der Standardkurve die IL-6 Konzentration ermittelt werden.

3.4 MTT-Assay

Der MTT-Assay wird normalerweise zur Messung der Zellproliferation verwendet. Da die metabolische Umwandlung des MTT-Salzes (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolinumbromid) durch aktive mitochondriale Dehydrogenase von lebenden Zellen vermittelt wird, kann der Test auch indirekt für die Beurteilung der Zellvitalität verwendet werden [85]. Nach Exposition der HPMC mit den zu testenden PDL wurden die Zellen mit MTT in einer Konzentration von 1.25 mg/ml in Kulturmedium für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Das sich bildende Formazanprodukt wurde nach vier Stunden durch

Hinzufügung von Lysepuffer, der aus 10% Sodiumdodecylsulfat und 50% N,N-Dimethylformamid besteht, gelöst. Die Absorption der Farbumwandlung wurde dann nach Inkubation in lichtgeschützter Umgebung über Nacht im Spektralphotometer bei 595 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

3.4.1 Herstellung der MTT-Lösung

5 mg MTT der Firma Sigma wurden in 100 ml PBS gelöst (5 mg/ml) und dann sterilfiltriert. Diese Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

3.4.2 Herstellung des Lysepuffers

Der Lysepuffer bestand aus 20 g SDS, 50 ml N-N-Dimethylformamid und 50 ml Aqua bidest. und wurde mittels eines Säuregemisches (80 ml Azetonsäureglacial, 2.5ml 1N HCl und 17.5ml Aqua bidest.) auf einen pH-Wert von 4.7 eingestellt.

3.5 Proteinbestimmung

Mittels Erstellung einer Verdünnungsreihe aus dem Proteinstandard des bovinen Serum Albumin (Biorad, Richmond, USA) wurde eine Standardkurve erstellt. Diese diente als Vergleich zu den zu messenden Proben, dessen optische Dichte nach Zusatz einer unverdünnten Farbreagenz (Biorad, Richmond, USA) im Spektralphotometer bei 595 nm Wellenlänge gemessen wurden.

3.6 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung sämtlicher Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 3.03 der Firma GraphPad Software auf einer Pentium-Workstation der Firma Lifetech. Es wurden nicht-parametrische ANOVA-Modelle (Friedman-Test mit Dunns Posttest) eingesetzt. Ein zweiseitiger p-Wert von <0.05 wurde als statistisches Signifikanzniveau angesehen. Ein * (Stern) in den Abbildungen 8 bis 20 kennzeichnet einen signifikanten ($p < 0.05$) Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

4 Ergebnisse

4.1 Glukose als osmotisches Agens – alternativ sterilisierte Glukose-PDL im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL

4.1.1 Niedrigglukosehaltige PDL (1.5% Glukose) - Präinkubation

Die Präinkubation von HPMC mit hitzesterilisierter PDL führte zu einer zeitabhängigen Minderung der Vitalität der Zellen im Vergleich zum Kontrollmedium, die nach vier Stunden Präinkubation signifikant wurde. Im Vergleich dazu kam es zur geringeren Vitalitätsminderung für die filtersterilisierte und die alternativ hergestellte PDL (Abbildung 8). Eine ähnliche Beziehung wurde für die Synthesefunktion der Zellen, für die wir stellvertretend das IL-6 untersucht haben, gefunden. Hier war der Synthesefunktionsverlust allerdings auch für die mit der filtersterilisierten PDL behandelten Zellen nach vier Stunden signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9).

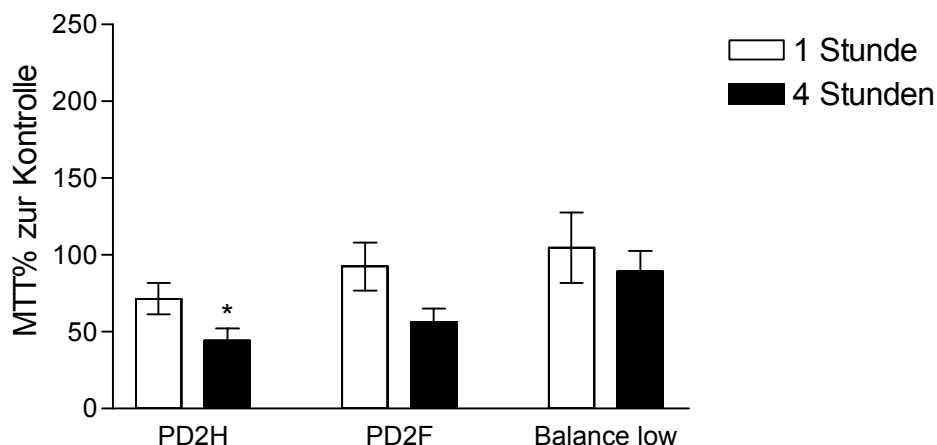


Abbildung 8: Zellvitalität von HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199. Gezeigt ist die prozentuale Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte±SEM von n=12 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199). (PD2H ist die hitzesterilisierte und PD2F die filtersterilisierte 1.5% Glukoselösung.)

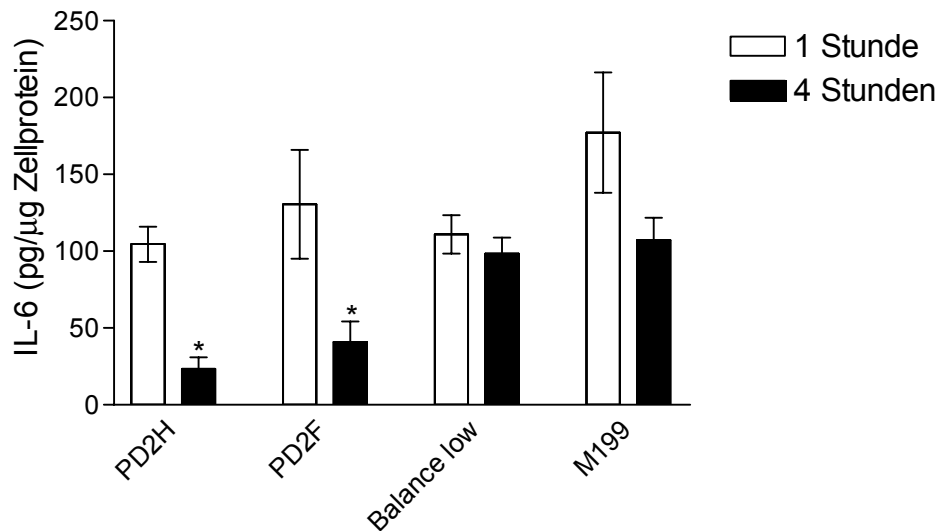


Abbildung 9: Freisetzung von IL-6 aus HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199 unter Stimulation mit rekombinantem IL-1 β . Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=12 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

4.1.2 Niedrigglukosehaltige PDL (1.5% Glukose) – chronische Inkubation

Wurden die HPMC chronisch, in diesem Fall bis zu zehn Tagen mit den PDL inkubiert, so wurde ein kontinuierlicher Vitalitäts- und Synthesefunktionsverlust für die Zellen gefunden, die mit der hitzesterilisierten PDL (hoher Gehalt an GDP) behandelt wurden. Dieser Verlust wurde hinsichtlich der Vitalität ab dem siebten Tag und bezüglich der Synthesefunktion ab dem zehnten Tag signifikant. Sowohl die filtersterilisierte PDL als auch die alternativ hergestellte PDL (niedriger Gehalt an GDP) veränderten weder die Vitalität noch die Synthesefunktion der Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Abb.10-11).

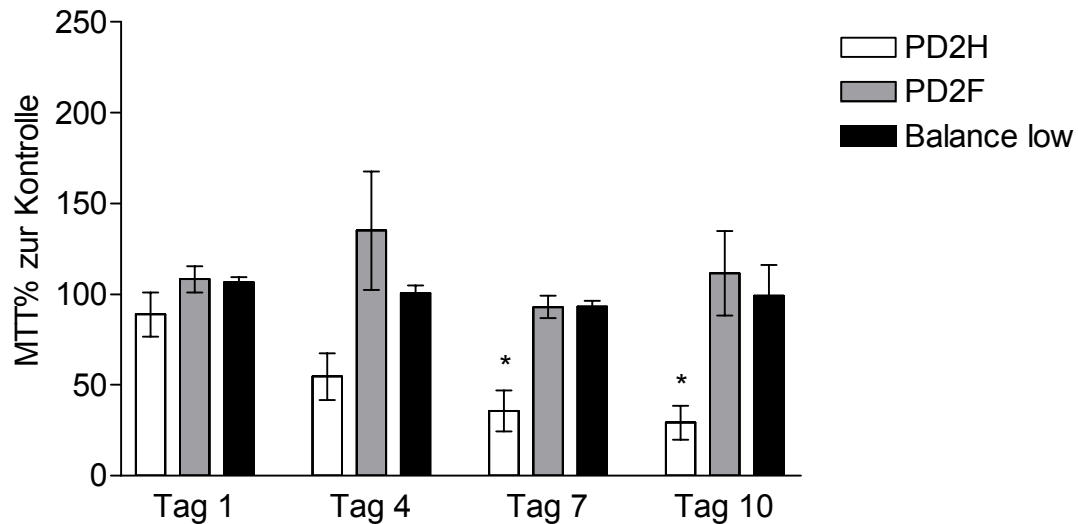


Abbildung 10: Zellvitalität von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose) über zehn Tage. Gezeigt ist die prozentuale Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=11 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

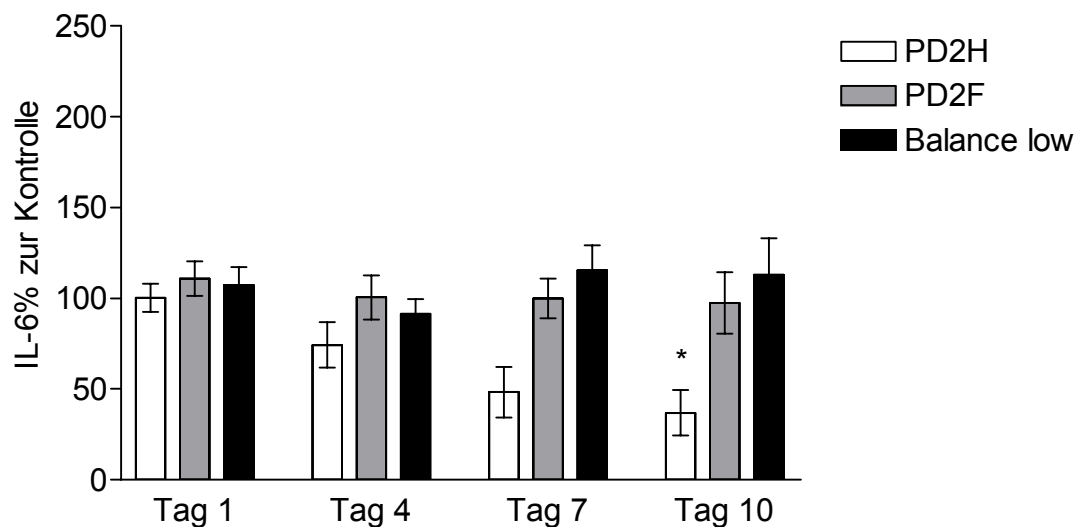


Abbildung 11: IL-6-Freisetzung von HPMC chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (1.5% Glukose) über zehn Tage. Gezeigt ist die prozentuale IL-6-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=11 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

4.1.3 Hochglukosehaltige PDL (4.25% Glukose) - Präinkubation

Die Inkubation von glukosehaltigen PDL mit hohem Glukoseanteil (hohe Osmolalität) führte sowohl bei der hitze- als auch bei der filtersterilisierten PDL zu einem Vitalitäts- und Synthesefunktionsverlust der Zellen nach vier Stunden Inkubation mit diesen Lösungen. Dabei wurde für die filtersterilisierte PDL nach einer Stunde Präinkubation kein Vitalitäts- oder Synthesefunktionsverlust gefunden. Der Vitalitätsverlust war für die hitzesterilisierte PDL nach einer Stunde tendenziell vorhanden aber nicht signifikant. Der Synthesefunktionsverlust war für diese Lösung bereits nach einer Stunde signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die alternativ sterilisierte PDL Balance high verursachte weder einen signifikanten Vitalitäts- (obwohl nach vier Stunden tendenziell vorhanden) noch Synthesefunktionsverlust (Abbildung 12-13).

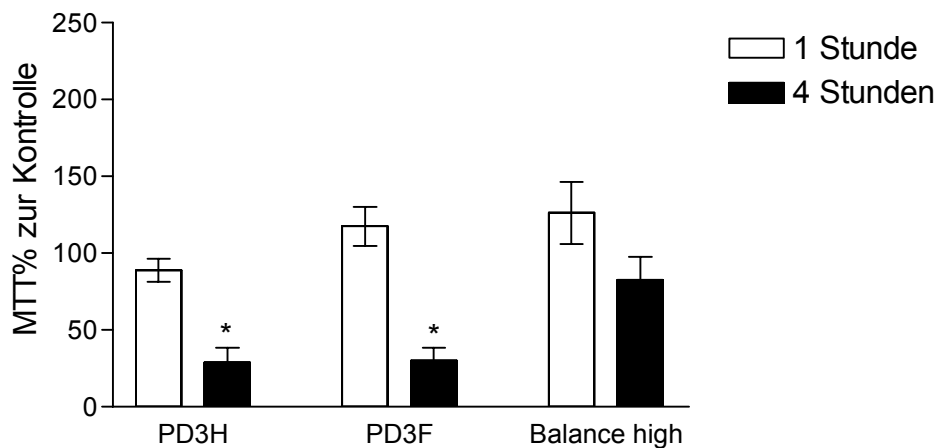


Abbildung 12: Zellvitalität von HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199. Gezeigt ist die prozentuale Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=12 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199). (PD3H ist die hitzesterilisierte und PD3F die filtersterilisierte 4.25% Glukoselösung.)

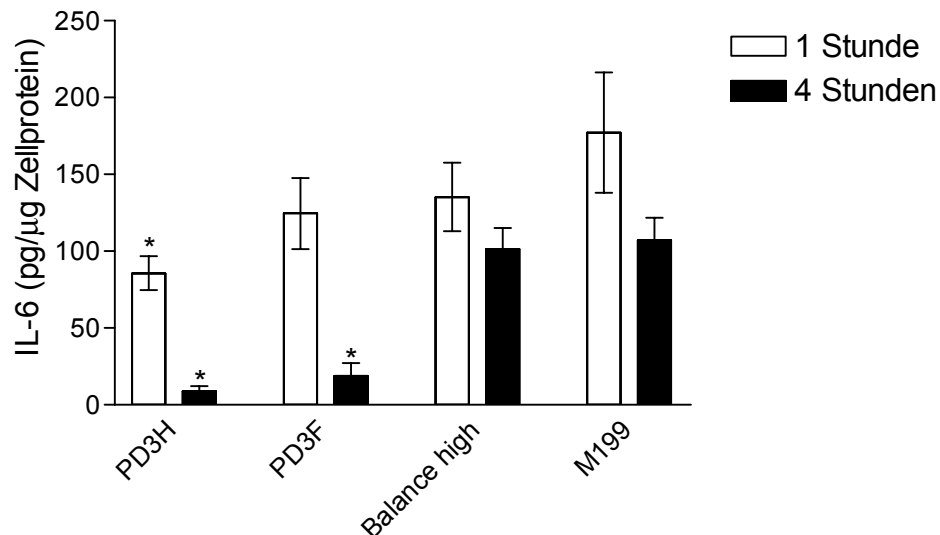


Abbildung 13: Freisetzung von IL-6 aus HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose), gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199 unter Stimulation mit rekombinantem IL-1 β . Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=12 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

4.1.4 Hochglukosehaltige PDL (4.25% Glukose) – chronische Inkubation

Inkubierte man die HPMC mit den zu testenden PDL über zehn Tage, so war die Vitalität und Zellsynthesefunktion der Zellen, die mit der hitzesterilisierten PDL behandelt wurden, bereits ab dem ersten Tage im Vergleich zu der Kontrolle gemindert, sank kontinuierlich weiter und wurde ab Tag vier signifikant. Weder die filter- noch die alternativ sterilisierte PDL verursachte einen signifikanten Vitalitäts- oder Synthesefunktionsverlust, obwohl für die alternativ sterilisierte PDL eine leichte Abnahme der Vitalität von Tag eins bis Tag zehn beobachtet wurde (Abbildung 14-15).

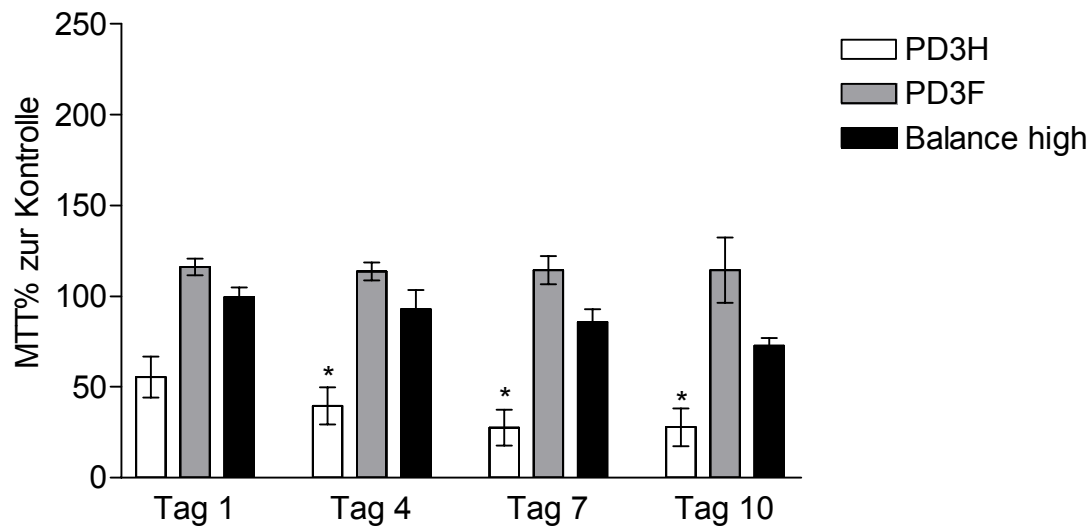


Abbildung 14: Zellvitalität von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose) über zehn Tage. Gezeigt ist die prozentuale Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=11 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199)

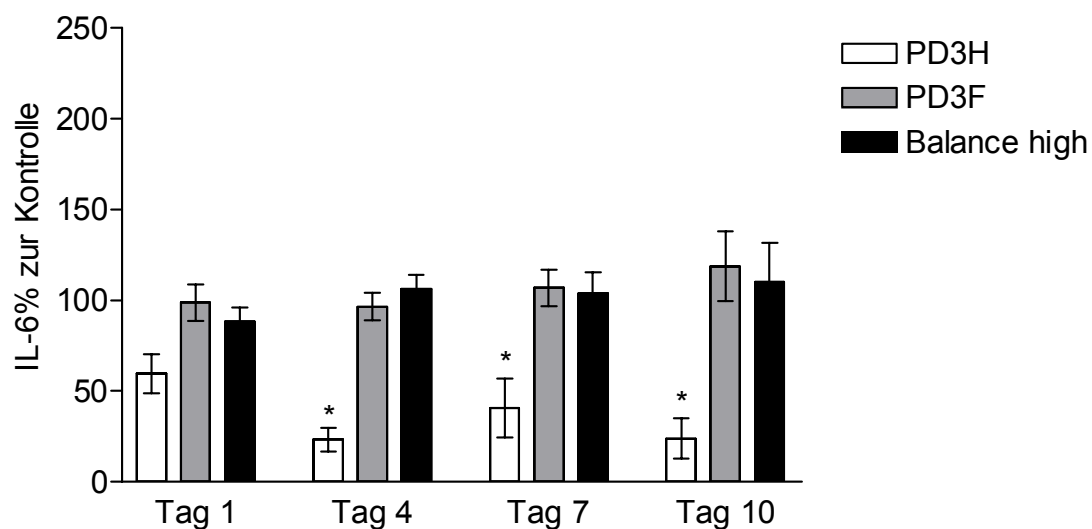


Abbildung 15: IL-6-Freisetzung von HPMC chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL (4.25% Glukose) über zehn Tage. Gezeigt ist die prozentuale IL-6-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=11 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

4.1.5 Phasenkontrastmikroskopie von humanen peritonealen Mesothelzellen, die chronisch mit verschiedenen sterilisierten Peritonealdialyselösungen behandelt wurden.

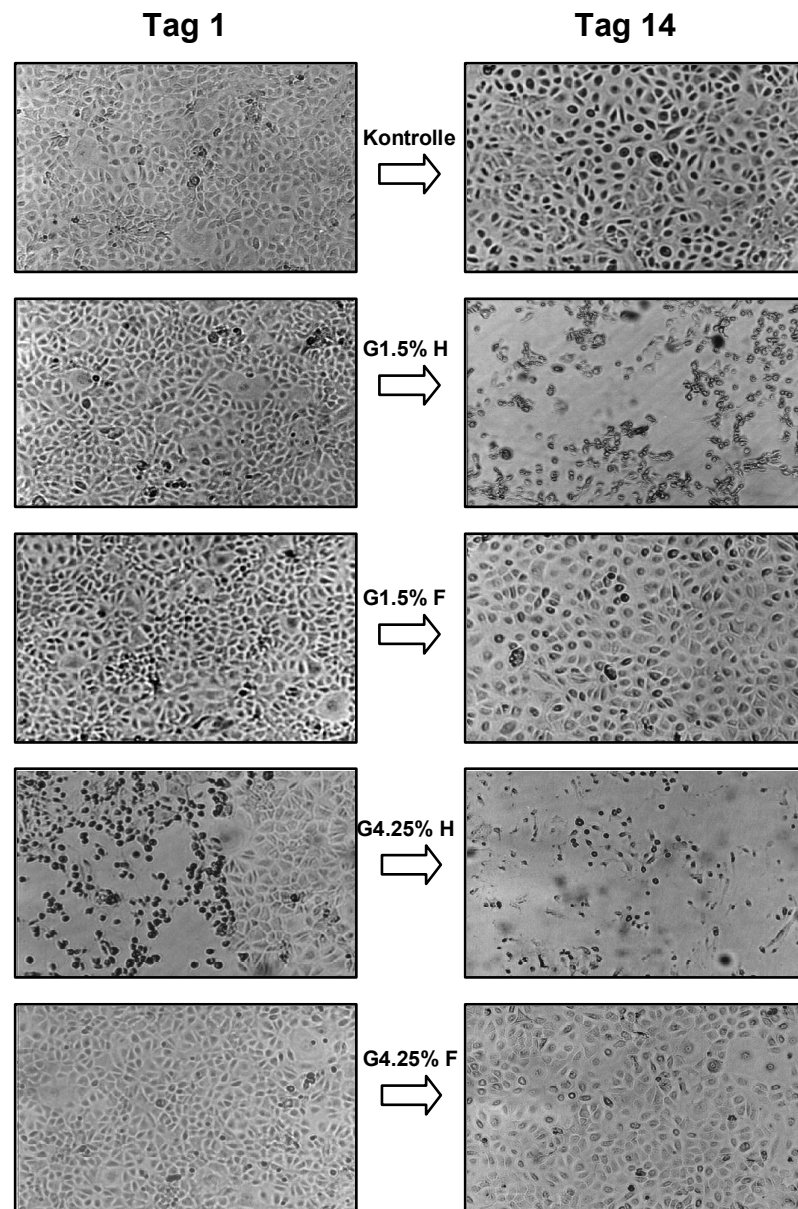


Abbildung 16: Phasenkontrastmikroskopie von humanen peritonealen Mesothelzellen, die chronisch mit verschiedenen sterilisierten Peritonealdialyselösungen behandelt wurden.

Die Abbildung 16 zeigt die Phasenkontrastmikroskopie von HPMC, die entweder mit hitze- oder filtersterilisierten glukosehaltigen PDL bis zu 14 Tage behandelt wurden. Dabei ist im

Vergleich zur Kontrolle (Zellkulturmedium mit 0.3% FKS) deutlich zu erkennen, dass die Zelldichte und Morphologie der Zellen, die mit den filtersterilisierten PDL behandelt wurden, von Tag eins bis Tag 14 wie die der Zellen der Kontrolle nahezu unverändert blieb. Hingegen führte die Behandlung mit den hitzesterilisierten PDL bis Tag 14 zu einer deutlichen Abnahme der Zelldichte und Veränderung der Morphologie der HPMC. Diese Veränderung ist für die hitzesterilisierte PDL mit hohem Glukoseanteil bereits ab dem ersten Tag erkennbar. Für die durchgeführten Experimente wurden alle untersuchten PDL 1:1 mit Zellkulturmedium (0.3% FKS-Endkonzentration) gemischt und alle drei Tage ausgetauscht.

4.2 Alternative osmotische Agenzien im Vergleich mit Standard-Glukose-PDL

4.2.1 Alternative osmotische Agenzien – Präinkubation

Konventionelle hitzesterilisierte PDL, die wie alle verwendeten PDL auf einen pH-Wert zwischen 7.2-7.6 eingestellt wurden, führten nach spätestens vier Stunden Präinkubation zu einem Vitalitäts- und Synthesefunktionsverlust der HPMC im Vergleich zu Zellkulturmedium als Kontrolle. Dieser Verlust wurde nach vier Stunden Präinkubation mit der PDL mit hohem Glukoseanteil signifikant. Ebenfalls wurde die Vitalität und Synthesefunktion der Zellen durch die alternative PDL Icodextrin nach spätestens vier Stunden, bzgl. der Synthesefunktion bereits ab einer Stunde signifikant gemindert. Hingegen führte die Inkubation mit der aminosäurehaltigen PDL Aminobic weder zu einem signifikanten Vitalitäts- noch Synthesefunktionsverlust (Abb. 17 und Abb. 18).

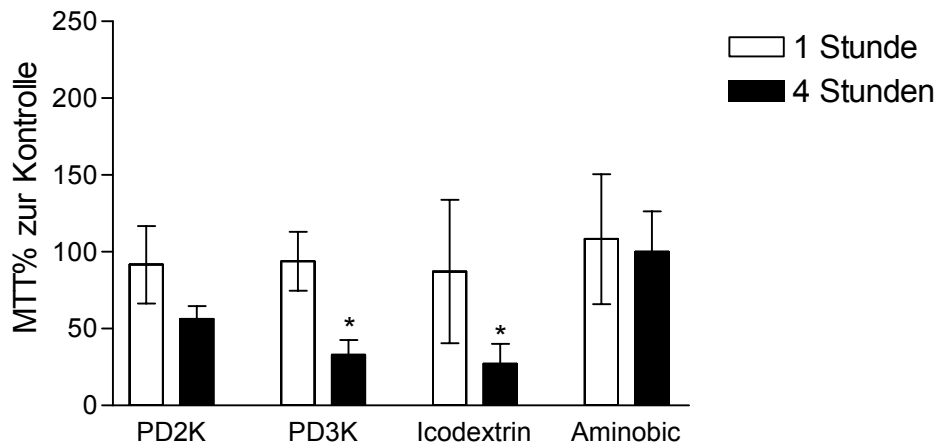


Abbildung 17: Zellvitalität von HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL, gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in M199. Gezeigt ist die prozentuale Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=12 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199). (PD2K und PD3K sind die kommerziellen hitzesterilisierten 1.5% und 4.25% Glukoselösungen.)

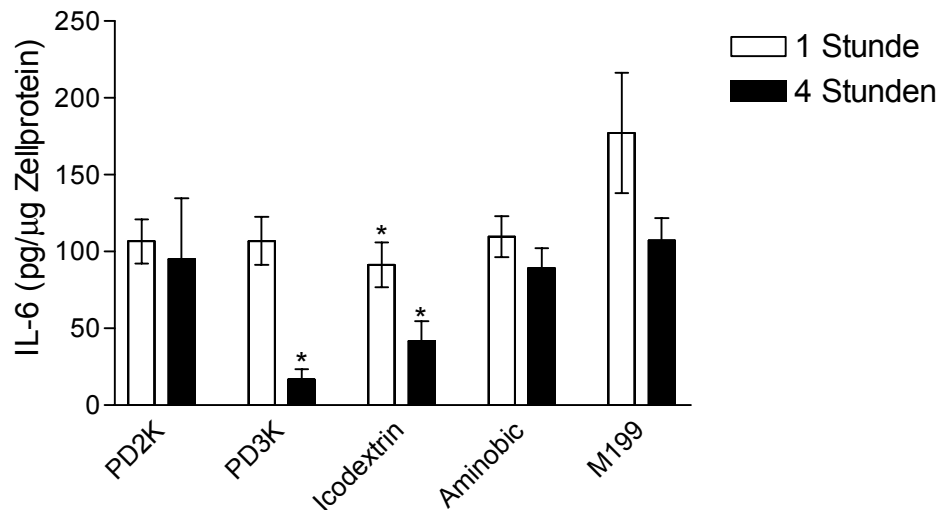


Abbildung 18: Freisetzung von IL-6 aus HPMC nach ein- und vierstündiger Präinkubation mit den gezeigten PDL, gefolgt von einer 24-stündigen Erholungszeit in

M199 unter Stimulation mit rekombinantem IL-1 β . Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=12 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

4.2.2 Alternative osmotische Agenzien – chronische Inkubation

Inkubiert man die HPMC mit konventionellen PDL repetitiv über zehn Tage in einer 1:1-Mischung mit Zellkulturmedium (0.3% FKS-Endkonzentration), so führt dies zu einer kontinuierlichen Abnahme der Vitalität und Synthesefunktion bis zum Tag 10. Dabei wird der Vitalitätsverlust für die konventionelle PDL mit hohem Glukoseanteil am zehnten Tag signifikant. Auch die alternative PDL Icodextrin führt zu einem kontinuierlichen Verlust der Vitalität und Zellsynthesefunktion, der am zehnten Tag für beide Parameter signifikant wird. Im Gegensatz dazu wird weder die Vitalität noch die Zellsynthesefunktion der HPMC durch die aminosäurehaltige PDL negativ beeinflusst (Abb.19-20).

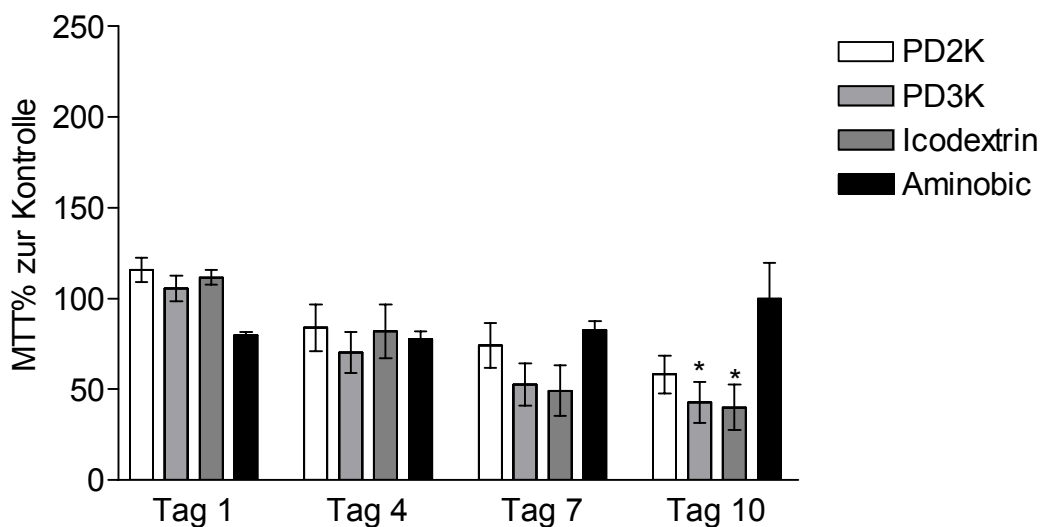


Abbildung 19: Zellvitalität von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL über 10 Tage. Gezeigt ist die prozentuale Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=11 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p<0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199).

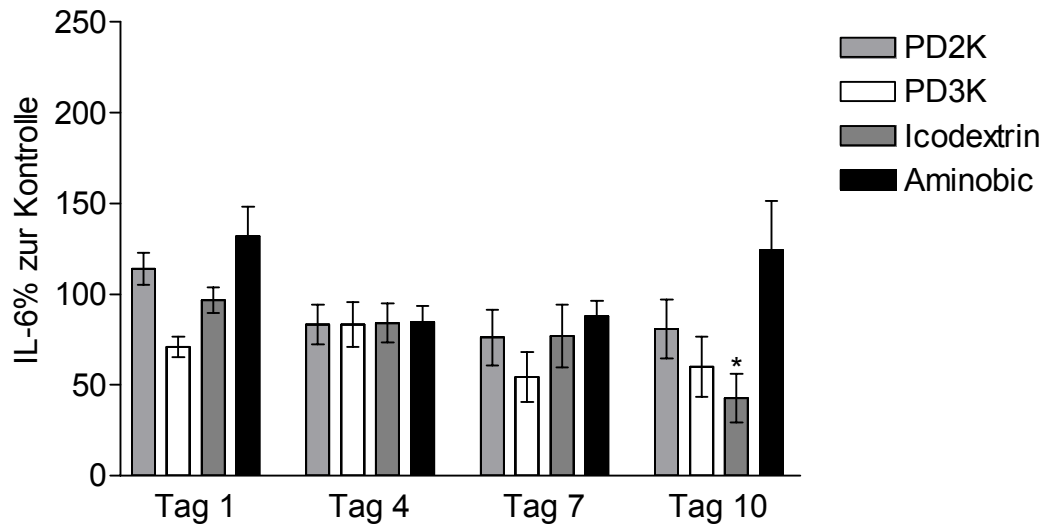


Abbildung 20: IL-6-Freisetzung von HPMC nach chronischer Inkubation mit den gezeigten PDL über 10 Tage. Gezeigt ist die prozentuale IL-6-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM von n=11 Experimenten. Sterne zeigen statistische Signifikanz mit $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle (M199)

5 Diskussion

Die Peritonealdialyse gehört zu den etablierten und im Vergleich zur Hämodialyse - unter Beachtung der Indikationen und Kontraindikationen - gleichwertigen Nierenersatzverfahren. Für den erfolgreichen Einsatz der Peritonealdialyse ist die Erhaltung der funktionellen Integrität der Peritonealmembran der entscheidende Faktor. Neben seinen reinen Transporteigenschaften beinhaltet die Rolle des Peritoneums ebenfalls vielschichtige weitere Funktionen wie etwa bei der peritonealen Infektabwehr sowie bei Synthese und Remodelling der extrazellulären Matrix. Bei der Peritonealdialyse ist das Peritoneum jedoch dauerhaft einer unphysiologischen Umgebung ausgesetzt, welche in erster Linie durch die instillierten Peritonealdialyselösungen (PDL) definiert ist. In diesem Kontext wurden durch die verschiedensten Arbeitsgruppen zunächst die Akuteffekte von Azidität und Hyperosmolalität der PDL auf die intraperitoneale Homöostase untersucht und ihre Bioinkompatibilität durch eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen u.a. unserer Arbeitsgruppe belegt. In jüngerer Zeit rücken darüber hinaus mögliche Langzeiteffekte der PDL auf die Morphologie und Funktion der Peritonealmembran in den Blickpunkt. Insbesondere die dauerhafte Exposition gegenüber hohen Konzentrationen von Glukose und Glukosedegradationsprodukten (GDP), die während der Hitzesterilisation entstehen, werden zunehmend mit chronischen Veränderungen des Peritoneum in Verbindung gebracht, dies sowohl bezogen auf direkte toxische Effekte, aber auch basierend auf indirekte Schädigungsmechanismen wie etwa der Bildung und Akkumulation von AGE (advanced glycation end products) in der Peritonealmembran.

5.1 Ergebnisdiskussion

Es folgt die Diskussion der Ergebnisse dieser Studie mit denen anderer Arbeitsgruppen. Diese ist untergliedert in den Vergleich von herkömmlichen mit alternativen glukosehaltigen PDL und den Vergleich herkömmlicher PDL mit PDL mit alternativen osmotischen Agenzien (aminosäurehaltige und icodextrinhaltige PDL) jeweils in ihren akuten und chronischen Effekten.

5.1.1 Glukose als osmotisches Agenz

In vitro akut nachweisbare Effekte auf die Integrität der residenten peritonealen Zellen üben die bekannten Faktoren, wie das osmotische Agenz (Glukose, Aminosäuren, Icodextrin), der

pH-Wert in Verbindung mit der verwendeten Puffersubstanz (Laktat, Bikarbonat oder Pyruvat) und die Osmolalität aus. Die durch den pH-Wert verursachte akute Toxizität wurde durch Einstellung des pH-Wertes aller verwendeten Peritonealdialyselösungen auf einen pH um 7.4 reduziert, um die PDL bezüglich anderer toxischer Bestandteile bzw. Eigenschaften besser miteinander vergleichen zu können.

5.1.1.1 Akute Effekte von glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen:

Glukose ist als osmotisches Agens in Peritonealdialyselösungen bislang nicht ersetzbar. Zwar gibt es alternative osmotische Agenzien, deren Vor- und Nachteile im weiteren noch diskutiert werden, doch sind diese Alternativen aus den schon in der Einleitung erwähnten Gründen nur für einen Beutelwechsel am Tag zu verwenden. Da der Ersatz dieses im Prinzip sehr sicheren und effektiven osmotischen Agens nicht absehbar ist, wurden Strategien entwickelt, um die Toxizität der fertigen PDL zu mindern. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Lösungen, die aufgrund ihrer Produktion und Sterilisation einen niedrigen pH-Wert und hohe GDP-Konzentrationen enthalten, sind die neueren Lösungen aufgrund der Verwendung von zwei getrennten Kammern in einem Beutel (während der Sterilisation, siehe Einleitung) bei Verwendung pH-neutral und enthalten sehr wenige GDP. Filtersterilisierte Glukoselösungen enthalten nahezu keine GDP (eine geringe Konzentration lässt sich durch die spontane Degradierung von Glukose in wässriger Lösung nicht vermeiden), daher müssten sie bezüglich der Zellvitalität und –synthesefunktion bessere Ergebnisse bieten als eine identisch zusammengesetzte hitzesterilisierte PDL. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bereits während einer einstündigen Präinkubation mit diesen beiden unverdünnten PDL ein besseres Überleben der Zellen mit den filtersterilisierten Lösungen ermöglicht wird. Nach vierstündiger Präinkubation wird dieser Vitalitätsunterschied signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings findet sich nach dieser Zeit auch ein signifikanter Unterschied der filtersterilisierten Lösung mit hohem Glukoseanteil (4.5%) im Vergleich zur Kontrolle. Dies liegt ursächlich vermutlich an der hohen Osmolalität der Lösungen mit hohem Glukoseanteil. Die Zellsynthesefunktion wurde überprüft, indem die Zellen auf die Fähigkeit untersucht wurden, auf einen inflammatorischen Reiz, in diesem Fall IL-1 β , mit der Produktion von IL-6 zu reagieren. Wir fanden hier ähnliche Ergebnisse wie für die Zellvitalität: Die filtersterilisierten PDL konnten die Zellsynthesefunktion tendenziell besser erhalten als die hitzesterilisierten PDL. Bereits nach einer Stunde konnte ein signifikanter Unterschied für die hitzesterilisierte PDL mit hohem Glukoseanteil im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden. Allerdings war die Zellsynthesefunktion nach vierstündiger Inkubation sowohl mit den hitze-

als auch filtersterilisierten PDL mit niedrigem und hohem Glukoseanteil im Vergleich zur Kontrolle signifikant gemindert. Nicht komplett geklärt werden konnte, warum sich die alternativ sterilisierten PDL (Balance), die sich in ihren Eigenschaften, nämlich den sehr geringen Anteil an GDP, von den filtersterilisierten Lösungen nicht wesentlich unterscheiden, zu nahezu keiner Minderung der Vitalität und Funktion der mit ihnen inkubierten Zellen führten. Auch nach vierstündiger Inkubation mit diesen PDL - selbst mit hohem Glukoseanteil - wurde die Vitalität und Funktion der Zellen kaum gemindert, dies im Kontrast zu den filtersterilisierten Lösungen. Eine Vermutung ist, dass der pH-Wert der kommerziell hergestellten alternativen PDL aufgrund eines ausgeglicheneren Puffersystems stabiler als bei den selbsthergestellten Lösungen war. Der pH-Wert der selbsthergestellten Lösungen wurde zwar vor jedem Versuch nachgemessen und nachjustiert, doch fiel hier bereits auf, dass sich der pH-Wert stärker unter gleichen Lagerungsbedingungen änderte, als bei den alternativen kommerziell erwerblichen Lösungen. Um die prolongierte Wirkung von PDL, die insbesondere durch die Glukosedegradationsprodukte verursacht wird, zu untersuchen, wurde das chronische Inkubationsmodell entwickelt. Dieses ermöglicht aufgrund der repetitiven Anwendung der PDL unter gleichzeitiger Reduktion der Osmolalität und besseren pH-Wert-Kontrolle durch Mischung mit Zellkulturmedium eine isoliertere Betrachtung der Wirkung der GDP. Die weitere Diskussion der glukosehaltigen Lösungen erfolgt im nächsten Abschnitt unter dem Gesichtspunkt der chronisch repetitiven Anwendung.

5.1.1.2 Chronische Effekte von glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen

Wie bereits erwähnt hat die Betrachtung der akuten Effekte der unverdünnten PDL einige Nachteile. So spielte sowohl die Osmolalität als auch die exakte pH-Wert-Einstellung eine zu große Bedeutung. Aus diesem Grund wurden in einem nächsten Schritt die chronischen Auswirkungen verschiedener PDL auf HPMC untersucht. Dabei kommt die in dieser Arbeit gewählte Versuchsanordnung dem Geschehen in vivo wesentlich näher: Dort ist die Peritonealmembran den verwendeten PDL über große Zeiträume (in der Regel viele Jahre) repetitiv ausgesetzt. Die Grundvoraussetzungen für biokompatiblere PDL sind, wie bereits mehrfach beschrieben, ein physiologischer pH-Wert und eine Osmolalität, die nicht zu hoch sein darf. Weniger wusste man bislang über die Wirkung von Glukosedegradationsprodukten, die bei der Hitzesterilisation von glukosehaltigen PDL entstehen, auf die Integrität der Peritonealmembran. Glukosedegradationsprodukte sind vermutlich für einen großen Anteil der negativen Eigenschaften der PDL verantwortlich: Bereits früh machten Wieslander et al. [86] auf die mögliche Bedeutung von GDP für die Stärke des Einlaufschmerzes beim

Patienten, die Häufigkeit von Peritonitiden durch negative Beeinflussung der Infektabwehr und den Verlust der Ultrafiltrationseigenschaften des Peritoneums entweder durch direkte toxische Wirkung auf die Peritonealzellen und/oder durch die Bildung von erweiterten glykosilierten Proteinen (advanced glycation end products – AGE) aufmerksam. So konnten Lamb et al. [87] die Bildung dieser „advanced glycation end products“ in Peritonealdialyselösungen nachweisen: Sowohl Patientendialysate, als auch frische PDL, denen jeweils Albumin zugesetzt wurde, glykosilierten dieses in Abhängigkeit von der Zeit. Nach dreiwöchiger Inkubation unterschieden sich die PDL in ihrer Glykosilierungswirkung (in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration) nicht von gepufferten Phosphatlösungen, die als Kontrollen eingesetzt wurden und denen gleiche Mengen an Albumin und Glukose zugesetzt waren, so dass Lamb et al. davon ausgingen, dass die PDL keine anderen Promotoren oder Inhibitoren dieser frühen Glykosilierungsreaktionen (Maillard-Reaktion) als Glukose und dessen Degradationsprodukte enthielten. Auch die möglicherweise relevanteren späten Glykosilierungsreaktionen, die für die Entwicklung von peritonealen Pathologien verantwortlich sein dürften, fanden nach mehrwöchiger Inkubation in vitro statt [87]. Dabei sind diese Reaktionen, d.h. die AGE-Bildung, in Patientendialysaten weder von der Glukosekonzentration noch von der prozentualen Glykosilierung des Albumin abhängig, obwohl diese Beziehung für die frühen Reaktionen gefunden werden konnte. Lamb et al. vermuteten, dass andere, auch inhibitorische Faktoren für die AGE-Bildung in den Dialysaten verantwortlich sind. Zeier et al. [88] konnten wiederum zeigen, dass GDP vom Dialysat vermutlich in den systemischen Kreislauf aufgenommen werden. Das GDP Methylglyoxal war bereits nach zwei Stunden intraperitonealer Verweildauer im Dialysat nicht mehr nachweisbar. Sie konnten weiter nachweisen, dass sowohl Vorstufen der AGE-Bildung (Amadori-Produkte) als auch AGE vermehrt im systemischen Kreislauf der Patienten gefunden werden konnten, die mit konventionellen im Vergleich zu GDP-armen PDL behandelt worden waren.

Betrachtet man die Vorstufen dieser AGE, die Glukosedegradationsprodukte, so ist inzwischen bekannt, dass diese in den Konzentrationen, wie sie in den kommerziell erhältlichen PDL vorhanden sind, eine nur geringe akut toxische Wirkung auf die Zellen haben [61]. Witowski et al. verwendeten einen GDP-Mix, der nur in sehr hohen Konzentrationen einen akut toxischen Effekt auf die Zellen hatte. Allerdings fehlte in diesem Mix das erst kürzlich entdeckte 3,4-DGE, welches vermutlich den stärksten toxischen Effekt auf die Peritonealzellen hat [59,89]. Aufgrund der trotz allem geringen akut toxischen Wirkungen von GDP war die Entwicklung eines Zellkulturmodells erforderlich, das

Rückschlüsse über die chronischen Effekte von PDL und deren unterschiedlich hohen GDP-Konzentrationen zu lässt. So wurden in dieser Arbeit im Labor hergestellte laktatgepufferte Glukose-PDL, die entweder hitze- oder filtersterilisiert wurden, sowohl miteinander als auch mit alternativ sterilisierten kommerziellen laktatgepufferten Glukose-PDL (Balance) verglichen.

Bereits 1991 veröffentlichten Wieslander et al. [49] Untersuchungen bezüglich der Wirkung von Glukosedegradationsprodukten an der Fibroblastenlinie L-929 (siehe Einleitung). Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass der Prozess der Sterilisation einen Einfluss auf die Toxizität von Peritonealdialyselösungen haben muss. Seither sind eine Vielzahl von Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit der Bildung von Glukosedegradationsprodukten und ihrer Wirkung auf die verschiedenen peritonealen Zellsysteme beschäftigen. Mit zunehmender Erkenntnis über die Bedeutung von GDP beschäftigten sich viele Autoren zwangsläufig auch mit der Frage nach der Vermeidung dieser bei der Hitzesterilisation von Glukose-PDL entstehenden Degradationsprodukten. So konnte die Gruppe um Wieslander [90] zeigen, dass PDL (pH 6.3 bis 6.4), die zum Zwecke der Reduzierung von GDP in zweikammrigen Beuteln sterilisiert wurden, im Vergleich zu ansonsten nahezu identischen herkömmlichen Glukose-PDL (pH 5.3-5.4) in einkammrigen Beuteln, sowohl eine geringere Zytotoxizität als auch besser erhaltene Funktion im Sinne der höheren stimulierten Ausschüttung von IL-1 β durch humane mononukleäre Zellen in vitro aufwiesen. Dabei waren nachweislich weniger GDP in der Zweikammer-PDL enthalten. Das gleiche Prinzip liegt den von uns getesteten alternativ sterilisierten PDL (Balance, Fresenius) zugrunde, die wir in ihrer Wirkung auf humane peritoneale Mesothelzellen im Vergleich mit hitze- und filtersterilisierten PDL einsetzten. Das Prinzip der Zweikammerbeutel beruht wie bereits in der Einleitung ausführlich erläutert darauf, dass man Glukose und Elektrolyte vom verwendeten Puffer (Laktat und/oder Bikarbonat) getrennt hitzesterilisiert. Dabei wird die Entstehung von GDP nachweislich (siehe Tabelle 5, Referenz [91]) dadurch reduziert, dass die Glukose und Elektrolyte bei einem niedrigem pH-Wert von 2.8-3.1 vom Puffer getrennt hitzesterilisiert werden kann. In der zweiten Kammer wird der Puffer Laktat bei einem pH-Wert zwischen 8.0 und 8.6 sterilisiert. Nach Mischung der beiden Kammern kurz vor Anwendung durch den Patienten, weist die endgültige Lösung einen nahezu neutralen pH zwischen 6.8 und 7.4 auf. Gleichzeitig verhindert man auch die Bildung von Degradationsprodukten, die während längerer Lagerzeit der (auch filtersterilisierten) PDL entstehen würden.

Tabelle 5: Vergleich des Inhaltes einiger GDP in Balance low/high versus CAPD2/3
*** kennzeichnet untere Nachweisgrenze in der HPLC [91]**

PDL:	3-Deoxyglucoson ($\mu\text{mol/l}$)	Methylglyoxal ($\mu\text{mol/l}$)	Acetataldehyd ($\mu\text{mol/l}$)	Formaldehyd ($\mu\text{mol/l}$)
CAPD2	172	6	152	7
Balance low	42	<1*	<2*	<3*
CAPD3	324	10	182	13
Balance high	60	<1*	<2*	<3*

Nach sieben Tagen für die 1.5%- und nach bereits vier Tagen für die 4.25%-Glukose-PDL konnten wir nach „chronischer“ Inkubation der HPMC eine signifikante Minderung der Vitalität der Zellen, die mit den hitzesterilisierten PDL behandelt wurden, feststellen. Hingegen verursachte weder die filtersterilisierte noch die alternativ sterilisierte PDL einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Ein ähnliches Ergebnis fanden wir für die Synthesefunktion der Zellen ausgedrückt durch die IL-1 β -stimulierte IL-6-Freisetzung: Hier wurde die Synthesefunktion der Zellen für die hitzesterilisierte 1.5%-Glukose PDL ab Tag zehn und für die hitzesterilisierte 4.25%-Glukose PDL bereits ab Tag vier im Vergleich zur Kontrolle signifikant gemindert. Hingegen blieb die Funktion der Zellen bis Tag zehn für die filtersterilisierten und kommerziellen Zweikammerlösungen voll erhalten.

Auch für eine mischgepufferte Bikarbonat/Laktat-PDL (G3.86%, pH 7.3), die in einem Zweikammerbeutel sterilisiert wurde, konnte gezeigt werden (Cooker et al. [92]), dass sie weniger GDP enthält und das Zellwachstum von L929-Fibroblasten weniger stark beeinträchtigt als laktatgepufferte Glukose-PDL (G3.86%, pH 5.2 \Rightarrow vor Versuch angeglichen auf neutrale Werte) ähnlichen Inhaltes in einkammrigen Beuteln. Durch Cooker et al. konnten keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum der L929-Fibroblasten zwischen hitzesterilisierten G1.36% bzw. G2.27% und ihren filtersterilisierten Pendant beobachtet werden.

Neben der Sterilisierung von Glukose (in einer separaten Kammer) mit niedrigem pH gelingt die Reduzierung von GDP auch durch Verkürzung der Sterilisationsdauer unter Erhöhung der Temperatur. Kjellstrand et al. [44] konnten zeigen, dass durch Erhöhung der Sterilisationstemperatur unter gleichzeitiger Senkung der Dauer des Sterilisationsprozesses

das Zellwachstum von L929-Fibroblasten nach Behandlung mit solch einer Lösung weniger stark supprimiert wurde.

Im Tierexperiment der Ratte über zehn Wochen Dauer verursachte eine laktatgepufferte und hitzesterilisierte Glukose-PDL (pH 5.2, Glukose 3.86%) im Vergleich zu der gleichen aber filtersterilisierten PDL eine zusätzliche Induktion von milchspritzerähnlichen Veränderungen am Omentum sowie einen starken Mesothelzellschaden [93].

Die klinische Relevanz der Reduzierung der GDP in Peritonealdialyselösungen kommt in Ansätzen in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Rippe et al. [94] zum Ausdruck. Rippe und Mitarbeiter setzten über einen Zeitraum von zwei Jahren bei 80 CAPD-Patienten entweder herkömmliche Glukose-PDL (1.5%, 4.25%) in Einkammerbeuteln (pH 5.3 - 5.43) oder Glukose-PDL (1.5%, 4.25%) in Zweikammerbeuteln (pH 6.26 – 6.43) mit nachweislich reduzierten GDP ein. Dabei konnten sie keinen Nachteil der neuen Lösungen bezüglich des peritonealen Flüssigkeits- oder Stofftransportes im Vergleich zu den herkömmlichen PDL finden. Im Gegensatz zu den herkömmlichen PDL konnte in den Dialysaten der Patienten, die mit den neuen Lösungen behandelt wurden, bereits nach einem Monat verbesserte Biokompatibilitätsparameter bzw. ein geringerer mesothelialer und interstitieller Schaden (CA125, Hyaluronon, Procollagen-1-C-terminales-Peptid, Procollagen-3-N-terminales-Peptid) gefunden werden. Für den Biokompatibilitätsvorteil der neuen Lösung sind sowohl erhöhter pH, als auch reduzierte GDP verantwortlich (der in den Lösungen enthaltende Puffer wurde nicht angegeben). In einer weiteren Studie von Jonasson et al. [95] wurden insgesamt 22 Patienten entweder mit einer GDP-armen PDL mit nahezu neutralem pH-Wert (n=10, Gambrosol Trio, Gambro) behandelt oder mit einer konventionellen PDL mit hohem GDP-Gehalt und niedrigem pH-Wert (n=12, konventionelle PDL, Gambro). Das Effluat wurde nach einem nächtlichen Wechsel gesammelt und die darin enthaltenden Leukozyten auf ihre Morphologie und Chemilumineszenzfähigkeit untersucht: Dabei enthielten die Leukozyten der Patienten, die mit der GDP-armen PDL behandelt wurden, einen signifikant höheren Makrophagenanteil und hatten eine tendenziell bessere Chemilumineszenzaktivität nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan. Desweiteren kam es in der konventionellen Gruppe zu signifikant erhöhter Nekrose der Leukozyten.

5.1.2 Akute und chronische Effekte von aminosäurehaltigen Peritonealdialyselösungen:

Die bikarbonatgepufferete aminosäurehaltige Lösung Aminobic ist wie bereits erläutert (siehe Einleitung) aus nutritiven Erwägungen entwickelt worden. Sie ist in Kombination mit dem Puffer Bikarbonat pH-neutral und hat eine nur mäßig hohe Osmolalität (369 mOsm/kg). Wir konnten zeigen, dass die aminosäurehaltige Lösung weder die Vitalität noch die Funktion von HPMC beeinflusst. Dies gilt sowohl für kurze Präinkubationszeiten von ein und vier Stunden (Abb.17-18), als auch für die repetitive Anwendung über einen Zeitraum von bis zu zehn Tagen (Abb.19-20).

Für periphere mononukleäre Leukozyten (PBMC) konnten Jörres et al. [20] keinen Unterschied bezüglich der Zytokin-mRNA-Expression und Synthesefunktion bis zu zwei Stunden Inkubationsdauer mit der aminosäurehaltigen PDL (Aminobic) im Vergleich zum Kontrollmedium finden. Somit scheint der relativ hohe Anteil an Aminosäuren in Aminobic keinen intrinsischen Effekt auf die Zytokinproduktion der genannten Zellen zu besitzen.

Im Vergleich zu laktatgepufferten Standardglukoselösungen (pH 5.2, Glucose: 1,36%, 2,27%, 3,86%) fanden Brulez et al. [96] eine verbesserte (in vitro) Phagozytoseaktivität gegen Bakterien (*Staphylococcus*) und eine erhöhte Vitalität von Spendergranulozyten (PMN), nachdem diese für 30 Minuten mit einer 1.1% Aminosäuren-PDL (pH 6.7, laktatgepuffert) behandelt wurden im Vergleich zu den Zellen, die mit den laktatgepufferten Glukose-PDL inkubiert wurden. Allerdings waren die Unterschiede in der Phagozytoseaktivität der Zellen nach Angleichung des pH-Wertes aller PDL auf 7.3 zum größten Teil nicht mehr signifikant. Dies unterstreicht noch einmal die Bedeutung des pH-Wertes für die Biokompatibilität.

Weiter fanden Brulez et al. eine signifikant schlechtere Antwort der PMN (Peritonealmakrophagen) in Aminosäuren-PDL (angeglichen auf pH-Wert 7.3) im Chemilumineszenstest (Aussage über metabolisch-oxidative-Antwort von Peritonealmakrophagen) als die PMN in 1.36% Glukose-PDL (ebenfalls angeglichen auf pH-Wert 7.3). Sie vermuteten einen negativen Effekt von einer oder mehrerer Aminosäuren und/oder einen negativen Einfluss der leicht höheren Osmolalität der Aminosäuren-PDL (365 vs. 347 mOsmol/L der 1.36% Glukose-PDL). Im Hinblick auf die Synthesefunktion (IL-6-Produktion) konnte bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen im Gegensatz zu denen von Brulez et al. durchgeführten Experimenten ein Biokompatibilitätsvorteil der Aminosäurenlösung gefunden werden. Da die Osmolalitäten sich ähnlich verhielten (siehe Tabelle 4), erklärt vermutlich die andere Zusammensetzung der von ihm verwendeten Aminosäurenlösung den Effekt im Chemilumineszenstest.

Die gleichen Autoren konnten später [97] in einer Studie mit peritonealen Makrophagen von zehn CAPD-Patienten signifikant bessere Phagozytosekapazitäten der Zellen nachweisen, die mit der 1.1% Aminosäurenlösung im Vergleich zu denjenigen Makrophagen, die mit 2.27% glukosebasierter PDL behandelt worden waren. Weiterhin wurde eine nach LPS-Stimulation signifikant höhere IL-1 β - und IL-8-Produktion der peritonealen Makrophagen gefunden, die mit 2.27% glukosebasierter-PDL im Vergleich zu den Zellen die mit 1.1% Aminosäurenlösung behandelt worden waren. Die Autoren vermuteten als Ursache der erhöhten Interleukinproduktion eine stärkere intraabdominelle Aktivierung der Makrophagen, die mit Glukose-PDL in Kontakt kamen, das möglicherweise das stärkere chemisch inflammatorische Agens als Aminosäuren-PDL war.

Plum et al. (9) verglichen die in vivo und in vitro Effekte von bikarbonatgepufferter Aminosäurenlösung und Glukoselösung mit denen einer herkömmlichen 1.5% laktatgepufferten Glukoselösung. So konnten sie an mononukleären Leukozyten in vitro eine weniger starke Supprimierung der Interleukinausschüttung IL-6 und IL-1 β nach LPS-Stimulation bei den neutralen (pH7.4) und bikarbonatgepufferten PDL im Vergleich zu der herkömmlichen laktatgepufferten Glukoselösung finden. Dabei waren bei Patienten in vivo keine Unterschiede bezüglich der Ultrafiltrationsraten zwischen den drei PDL feststellbar. Gleiches fanden Plum et al. auch für die Harnstoff- und Kreatininclearance.

Jörres et al. [20] verglichen eine aminosäurehaltige PDL mit herkömmlichen glukosehaltigen PDL, die entweder laktat- oder bikarbonatgepuffert waren, in ihrer Wirkung auf periphere mononukleäre Leukozyten (PBMC) als Vorstufe der Peritonealmakrophagen. Nach 10, 20 oder 30 Minuten Präinkubation mit der jeweiligen PDL folgte eine zweistündige LPS-Stimulation der Zellen in dem Zellkulturmedium RPMI. Dann wurde im ELISA TNF α und IL-6 gemessen. Es konnte bis 30 Minuten Präinkubation im Vergleich zur Kontrolle (RPMI-Medium) keine signifikante Minderung der TNF α -Ausschüttung der Zellen gefunden werden, die mit Aminobic oder der bikarbonatgepufferten Glukoselösung (1.5% Glukose, pH7.4) inkubiert wurden. Aber bereits ab 10 Minuten Präinkubation mit CAPD2 (pH5.5) oder ab 20 Minuten für die hochprozentige bikarbonatgepufferte Lösung (4.25% Glukose, pH7.4) war die TNF α -Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle signifikant gemindert. IL-6 war für die mit Aminobic präinkubierten Zellen erst ab 30 Minuten signifikant zur Kontrolle gemindert. Im Gegenteil dazu war IL-6 für die Präinkubation mit CAPD2 und der bikarbonatgepufferten 4.25%-Lösung bereits ab 10 Minuten und für die bikarbonatgepufferte 1.5%-Lösung ab 20 Minuten gemindert. Aus den Ergebnissen dieser

Studie lässt sich auf eine bessere Biokompatibilität von aminosäurehaltigen PDL (hier Aminobic) im Vergleich zu glukosehaltigen laktat- oder bikarbonatgepufferten PDL schließen. Dabei hat natürlich neben den unterschiedlich hohen pH-Wert und GDP-Gehalt der getesteten laktat- und bikarbonatgepufferten Glukose-PDL auch die deutlich höhere Osmolalität von 4.25% Glukose enthaltender bikarbonatgepufferter PDL einen negativen Effekt auf die PBMC. Da in vivo der Ausgleich der Hyperosmolalität länger als der pH-Ausgleich dauert, scheint die Hyperosmolalität und natürlich die in den laktatgepufferten konventionellen CAPD2/3-Lösungen vermehrt enthaltenden GDP eine größere Rolle zu spielen.

Erste in-vivo-Experimente mit einer 1.1%igen laktatgepufferten Aminosäurenlösung (Baxter) im Vergleich zu herkömmlichen glukosehaltigen PDL (1.36% und 3.86% Glukose, Baxter) und ihrer Wirkung auf histologische Veränderungen beim Kaninchen wurden von Garosi et al. [98] durchgeführt. Die Kaninchen wurden für 60 Tage täglich mit je zwei Wechseln von je 30 ml/kg Körpergewicht der jeweiligen PDL behandelt. Dann wurde das Peritoneum in vivo fixiert, histologisch aufgearbeitet und licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Kriterien der Untersuchung waren: mesothelialer Schaden, submesotheliales Ödem, submesotheliale Zellinfiltration, submesotheliale Fibrose und vaskuläre Veränderungen. Im Vergleich zu den histologischen Präparaten der Kontrollkaninchen konnte bei den mit der Aminosäurenlösung behandelten Tieren kein mesothelialer Schaden (flaches kontinuierliches Mesothel) nachgewiesen werden. Hingegen wiesen die Tiere, die mit 1.36% bzw. 3.86% Glukose-PDL behandelt wurden, mittlere (kubisches, aber kontinuierliches Mesothel) bzw. schwere (kubisches und diskontinuierliches Mesothel) Schäden auf. Das Auftreten von submesotheliale Ödem zeigte eine zunehmende Tendenz von der Aminosäuren-PDL über die 1.36% Glukose-PDL bis zur 3.86% Glukose-PDL. Die submesotheliale Zellinfiltration war in allen Gruppen gleich und submesotheliale Fibrose oder vaskuläre Veränderungen wurden nicht beobachtet. Die einzige bedeutende Veränderung in der Aminosäuren-PDL-Gruppe war ein Verlust an Mikrovilli in der elektronenmikroskopischen Darstellung. Zusammenfassend konnte (erstmalig) gezeigt werden, dass die mangelnde Biokompatibilität der glukosehaltigen laktatgepufferten Glukose-PDL (pH5.0-5.5) ein histologisches Korrelat in vivo zeigten und histologische Veränderungen durch die Aminosäurenlösung im Vergleich zu Kontrollen in vivo nicht nachweisbar waren.

In einer kürzlich von Chan et al. veröffentlichten Arbeit [99] wurden die verschiedenen Effekte von Patientendialysat nach vierstündiger Verweildauer untersucht. Die Patienten wurden dabei mit einer 1.1%igen aminosäurehaltigen PDL (Nutrineal, Baxter, Illinois) im

Vergleich zu einer 1.5%igen glukosehaltigen PDL (Dianeal, Baxter, Illinois) behandelt. Das Dialysat wurde in seiner Wirkung auf die Ultrastruktur und Funktion von Mestothelzellen untersucht. Die Inkubation der Zellen mit dem Dialysat der Patienten, die mit der glukosehaltigen PDL behandelt wurden, führte zur signifikant reduzierten Zellproliferation, Proteinsynthese, IL-6-Ausschüttung, Zellhaftung und Vitalität (LDH-Ausschüttung erhöht). Außerdem erhöhte dieses Dialysat die Zeit bis zur Verdopplung der Zellzahl während einer 24-stündigen Erholungszeit. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Zellen mit dem Dialysat der Patienten, welche die aminosäurehaltige Lösung für den Wechsel benutzten, zu einer weniger stark reduzierten Zellproliferation, einer höheren IL-6-Ausschüttung (höher als Kontrolle) und einer im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Zellhaftung, Vitalität (LDH-Ausschüttung), Proteinsynthese und Zellverdopplungszeit. Bei der Betrachtung der Ultrastruktur der mit den unterschiedlichen Dialysaten behandelten Zellen wurde eine Zellabflachung, eine erhöhte Zelloberfläche, eine reduzierte Anzahl an Mikrovilli und intrazellulären Organellen, die vermutlich in der Funktion gestörte Mitochondrien darstellen, für die mit dem Glukosedialysat behandelten Zellen gefunden. Im Gegensatz dazu war die Ultrastruktur der Zellen, die mit dem Aminosäuredialysat behandelt wurden, nahezu intakt im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zusammenfassend schließen Chan et al., dass die Behandlung der Zellen mit dem Aminosäuredialysat eine verbesserte Ultrastruktur, Vitalität und Proteinsynthese im Vergleich zur Behandlung mit Glukosedialysat gewährleistet. Warum die IL-6-Ausschüttung der mit Aminosäuredialysat behandelten Zellen höher als die mit der Kontrolllösung behandelten Zellen war, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.1.3 Akute und chronische Effekte von icodextrinhaltigen Peritonealdialyselösungen:

Die im folgenden diskutierte PDL ist eine Polyglukoselösung (ausführliche Beschreibung siehe Frampton et al. [100]) bei der Icodextrin als alternatives osmotisches Agens anstelle von Glukose eingesetzt wird. Die Hauptvorteile dieser Lösung sind seine normale Osmolalität, die Ermöglichung von Ultrafiltration über lange Austauschperioden und die Vermeidung der metabolischen Risiken, die Glukose als Agens mit sich bringt. Inzwischen werden Glukosepolymere in vivo eingesetzt, und erste Erfahrungen im Einsatz beim Patienten sind gesammelt (siehe Einleitung).

Eine der ersten in vitro Experimente mit Glukosepolymeren stammen von Liberek et al. [101] und de Fijter et al. [102]: Liberek et al. untersuchten die Wirkung von einem Glukosepolymer (7.5%; pH 5.2; laktatgepuffert) im Vergleich zu zwei glukosehaltigen PDL (1.36% und 3.86%, pH 5.2, laktatgepuffert; Dianeal, Baxter) auf verschiedene für die Abwehrfunktion

wichtige Faktoren (Vitalität, Phagozytose, Leukotrien B₄-Synthese, „respiratory burst“-Aktivität) an peripheren Neutrophilen und humanen peritonealen Mesothelzellen. Dabei konnten sie zusammenfassend keine signifikanten Unterschiede zwischen den glukosehaltigen PDL und dem Glukose-Polymer bezüglich der getesteten Parameter des peritonealen Abwehrmechanismus feststellen, wobei die Zellvitalität erniedrigt und bakterielles Überleben in dem Glukosepolymer tendenziell erhöht zu sein schien.

De Fijter et al. [102] konnten bei der Untersuchung eines Glukosepolymers (7.5%, pH 5.3, laktatgepuffert; Polyneal, ML Laboratories PLC) signifikant bessere Phagozytoseraten von Spendergranulozyten und –monozyten nach Inkubation in dem Glukosepolymer im Vergleich zur Inkubation in einer 3.86% glukosehaltigen PDL (Dianeal, Baxter) finden. Auch die Chemilumineszenz (oxidativer Metabolismus) der Zellen war besser in dem Glukosepolymer verglichen mit 2.27% und 3.86% Glukose-PDL. Peritoneale Patientenmakrophagen wiesen in dem Glukosepolymer eine signifikant bessere Phagozytosekapazität für *S. epidermidis* und *E. coli* als in den getesteten Glukose-PDL (1.3%, 2.27%, 3.86%) auf. Hingegen war für die Zellvitalität von humanen peritonealen Mesothelzellen nach 4-stündiger Inkubation in dem Glukosepolymer im Vergleich zu den Glukose-PDL kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Jörres et al. [37] untersuchten ebenfalls die Wirkung einer icodextrinhaltigen PDL (Fresenius, pH5.5) im Vergleich zu glukosehaltigen bikarbonatgepufferten (G1.5% und G4.25%, pH7.4) und einer laktatgepufferten PDL (G1.5%) auf die Funktion (IL-6- und TNF α -Ausschüttung) von peripheren mononukleären Leukozyten (PBMC), die je zwei Stunden mit *Staph. epidermidis* und *E. coli* LPS stimuliert wurden. Sie fanden bei den mit *Staph. epidermidis* und *E. coli* LPS stimulierten PBMC eine signifikant erniedrigte IL-6- und TNF α -Ausschüttung gegenüber der Kontrolle (Medium) bei der G1.5%-PDL, bikarbonatgepufferten G4.25%-PDL und icodextrinhaltigen PDL (pH5.5). Dabei stieg die Interleukinausschüttung der mit Icodextrin behandelten Zellen bei Angleich des pH-Wertes dieser Lösung auf 7.4, und ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle war nach Angleichung des pH-Wertes nicht mehr registrierbar. Für die bikarbonatgepufferte G1.5%-PDL konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gefunden werden. Interessanterweise fanden sie für die IL-6/ α -Actin-Ratio in der PCR weder für die neutralisierte noch für nicht neutralisierte icodextrinhaltige PDL einen Unterschied zur Kontrolle, so dass Jörres et al. vermuten, dass Icodextrin 7.5% möglicherweise nur einen posttranskriptionellen Effekt bezüglich der IL-6-Ausschüttung auf die PBMC hat.

Rooney et al. [103] hingegen konnten keinen Unterschied zwischen laktatgepufferten Glukose-PDL (1.36%, 3.86% pH5.4) und einem Glukosepolymer (7.5%, pH5.4) in ihrer Wirkung auf humane peritoneale Mesothelzellen bezüglich Vitalität (MTT-Assay), IL-6- und Prostazyklinsekretion finden, nachdem die jeweiligen PDL nach Instillation in die Peritonealhöhle von je drei Patienten sofort wieder entfernt und die HPMC für 30 Minuten mit diesen Überständen inkubiert wurden. Alle drei Lösungen waren „gleich“ toxisch für die HPMC im Vergleich zur Kontrolle (signifikant). Interessanterweise war der toxische Effekt auf die HPMC aller drei getesteter PDL nach 15-minütiger intraperitonealer Verweildauer im Vergleich zur Kontrolle in vitro nicht mehr nachweisbar. Trotz dieser raschen in vivo Neutralisation der PDL-Toxizität vermuten die Autoren einen mesothelialen Schaden und eine Inhibition des peritonealen Abwehrmechanismus, da die frühe und beim chronischen Einsatz repetitive Wirkung der PDL auf die Zellen möglicherweise eine Zytokinkaskade in Gang setzt, welche ihre optimale Funktion beeinträchtigt.

Cooker et al. [104] veröffentlichten Daten, nach denen für pH-neutrale Icodextrinlösungen (7.5%, Extraneal, pH-neutral nach Mischung mit Zellkulturmedium), die hitze- oder filtersterilisiert waren, kein Unterschied im Wachstum von Fibroblasten der Maus im Vergleich zu Kontrollfibroblasten in Zellkulturmedium festzustellen war. Hingegen führte die Inkubation mit hitzesterilisierter 4.25% Glukose-PDL (Dianeal, Baxter) zur signifikanten Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrolle. Diese verbesserte Biokompatibilität des Glukose-Polymers führten die Autoren auf eine niedrigere Konzentration an Glukosedegradationsprodukten bei nachweisbar niedrigerer Konzentration des Glukosedegradationsproduktes Acetaldehyd im Vergleich zu den 2.5% und 4.25% Glukose-PDL zurück.

Einen günstigen Effekt von Icodextrin in Vergleich zu konventionellen Glukoselösungen bezüglich Zellvitalität und Funktion von HPMC konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr war Icodextrin im Vergleich zu Standardglukoselösungen unter kontrollierten Bedingungen, d.h. pH angeglichen auf nahezu neutrale Werte (pH um 7.4), in seiner Toxizität vergleichbar einer konventionellen hitzesterilisierten G4.25% Glukose-PDL. Nach vierstündiger Präinkubation mit dieser Lösung war die Vitalität von HPMC signifikant gemindert - die Funktion der Zellen bereits nach einstündiger Präinkubation. In der chronischen Versuchsanordnung nahmen sowohl Vitalität als auch Funktion der HPMC vom ersten bis zum zehnten Tag vergleichbar der G4.25%-Standardlösung ab. Dies wurde am zehnten Tag im Vergleich zur Kontrolllösung (Zellkulturmedium) signifikant.

Aktuell wurden auch von anderen Arbeitsgruppen Zweifel an der Biokompatibilität und Sicherheit von Polyglukoselösungen geäußert. Die Arbeitsgruppe Gotloib et al. [105] konnten die Beeinflussung des Zelllebenszyklusses von mesothelialen Mauszellpopulationen in vivo nach Exposition mit Glukose- und Polyglukose-PDL nachweisen. Dabei war die Vitalität dieser Zellen nach Exposition mit Polyglukose-PDL stärker herabgesetzt als nach Inkubation mit 4.25% Glukose-PDL. Im Gegensatz zu den meisten bereits zitierten in vitro Untersuchungen waren die Veränderungen unabhängig vom niedrigen pH-Wert, hoher Osmolalität und der Verwendung von Laktat oder Bikarbonat als Puffer. Eine wichtigere Rolle schien nach Gotloib et al. das verwendete osmotische Agens zu spielen. Die Hypothese der Arbeitsgruppe war, dass die Polyglukose unter anderem Radikalfänger reduziert und damit die Generation von reaktiven Oxidantien erhöht. Diese führen dann zur Blockierung der Zellproliferation, bewirken damit die vorzeitige Zellalterung und setzen Apoptosemechanismen in Gang. Dabei sah die Arbeitsgruppe die besondere Gefahr von Polyglukoselösungen in einem möglichen dysplastischen Effekt auf die damit behandelten Zellen. So konnten sie in Mauszellen, die mit dieser Lösung behandelt wurden, ein erhöhtes Kern/Zytoplasmaverhältnis im Vergleich zu den mit Glukose-PDL behandelten Zellen feststellen, wobei eine Ursache des erhöhten Kern/Zytoplasmaverhältnisses möglicherweise in einem dysplastischen Effekt auf die mit dem Glukosepolymer exponierten Zellen begründet liegt.

In zwei weiteren Studien konnte die gleiche Arbeitsgruppe die negative Wirkung von Icodextrin auf Mesothelzellen bestätigen. So wiesen die Mesothelzellen von Mäusen nach 60 Tagen Inkubationszeit mit Icodextrin und z.T. auch noch nach 60 Tagen Erholungszeit eine signifikant reduzierte Zelldichte, erhöhte Zellgröße, einen erhöhten Kern/Plasmaindex, eine erhöhte Anzahl an heterogenen Nukleoli, eine stark verminderte Mitoserate, atypische Mitose, Mikrozellkerne, eine verminderte Zellvitalität und eine signifikant erhöhte Apoptoserate auf. Mit Icodextrin behandelte Ratten wiesen außerdem eine erhöhte Fettperoxidation auf [106]. Die dreißigtägige Inkubation von peritonealem Mesothel mit Icodextrin führte zu einer depopulierten Zellschicht bestehend aus überalterten Zellen mit atypischen Kernveränderungen und atypischer Mitose. Gleichzeitig mit diesen Veränderungen führte die Inkubation zur Fettperoxidation unmittelbar nach Einbringen der Lösung in die abdominale Höhle von Ratten [107].

5.2 Methodenkritik - Grenzen des in vitro Zellkulturmodells

Aus den in dieser Studie dargestellten und den diskutierten (in vitro) Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, ist nicht ohne weiteres auf die beim Menschen in vivo geltenden Verhältnisse zu schließen:

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden ausschließlich mit Zellen der ersten drei Passagen durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass spätere Subkulturen zu viele alternde Zellen enthielten [28,29]. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der Zellgewinnung oder Passagierung nur die widerstandsfähigsten Zellen überlebten und für die Zellpopulation in vivo weniger repräsentativ sind. Oft sind die kultivierten Zellen allerdings auch dedifferenziert und dadurch vulnerabler als Zellen in vivo. Es wurden daher alle Experimente mit mindestens 5 Zelllinien verschiedener Patienten wiederholt.

Das Ausgangsmaterial für die HPMC, die Omentum majus Resektate, stammten ausschließlich von nierengesunden Patienten. Bei CAPD-Patienten sind die Peritonealzellen aber zumeist für viele Jahre einem urämischen Milieu ausgesetzt, welches Einfluss auf die Zusammensetzung, Vitalität und Funktion dieser Zellen haben könnte. Dabei ist eine weitere Frage, ob gerade die Zellen des Omentum majus für das gesamte Peritoneum repräsentativ sind.

Bei dem Zellkulturmodell, das den Untersuchungen dieser Arbeit zugrunde lag, handelt es sich um ein zweidimensionales System, welches uns eine Aussage über die direkten potenziellen Interaktionen (z.B. Interleukinausschüttungen) zwischen HPMC und den verwendeten PDL treffen lässt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass in vivo einige Funktionen der peritonealen Zellen, insbesondere von Fibroblasten, durch die Matrix, in der die Zellen wachsen, beeinflusst werden [36]. Beavis et al. [108] haben daher ein dreidimensionales Zellkulturmodell entwickelt, in dem die peritonealen Fibroblasten in einer Kollagenmatrix wachsen. Es bleibt abzuwarten, ob dieses relativ komplexe Modell neue Erkenntnisse über die Interaktion der Zellen bei der Inflamationsreaktion liefert. Zum anderen wären auch Zellkulturmodelle denkbar, welche die Untersuchung der Interaktionen zwischen Mesothelzellen und Fibroblasten ermöglichen.

Der CAPD-Zyklus in vivo ist ein dynamischer Prozess. In vitro Experimente, bei denen frische PDL benutzt werden, können die wichtigen Veränderungen in der Zusammensetzung des Dialysats während der Verweildauer in vivo nicht berücksichtigen.

In vivo erfolgt zum einen nach relativ kurzer Zeit (15 bis 30 Minuten [35]) ein pH-Ausgleich und zum anderen auch eine kontinuierliche Equilibration der Hyperosmolalität (ca. 4h) und Glukosekonzentration der PDL in der Peritonealhöhle [109].

Erste Untersuchungen Richtung Equilibration in vitro führten Witowski et al. [110] durch, indem sie während der Inkubationszeit von HPMC mit PDL schrittweise die PDL durch Patienteneffluat austauschten.

Seit Jahren sind Hunderte von Patienten mit „bioinkompatiblen“ PDL behandelt worden, aber die Quote der Patienten, die wegen Membranversagens die CAPD aufgeben mussten, ist nicht so hoch, wie man aufgrund der in vitro Ergebnisse vermuten könnte; allerdings immerhin ungefähr 50% in fünf Jahren.

Trotz all dieser Kritikpunkte erlauben uns die in vitro Modelle gerade in Bezug auf die maximale Toxizität einer Lösung eine Aussage zu treffen, da in vitro unter reproduzierbaren und kontrollierten Bedingungen, wie pH-Wert, Osmolalität und osmotisches Agenz gearbeitet werden kann.

6 Zusammenfassung:

Die Peritonealdialyse gehört zu den etablierten Nierenersatzverfahren. Peritonealdialyselösungen können die Vitalität und Funktion von humanen peritonealen Mesothelzellen beeinflussen. PH-Wert, Osmolalität und verwendeter Puffer gehören zu den für peritoneale Mesothelzellen (HPMC) akut toxisch wirkenden Faktoren. Während der Hitzesterilisation von glukosehaltigen Peritonealdialyselösungen (PDL) gebildete Glukosedegradationsprodukte (GDP) führen eher zu einer chronischen Funktionsstörung der HPMC. Alternativen zu glukosehaltigen PDL stellen aminosäuren- oder icodextrinhaltige PDL dar. Des Weiteren wurden alternativ sterilisierte glukosehaltige PDL entwickelt, die aufgrund der Sterilisation in Zweikammersystemen nur sehr wenige GDP enthalten. Bislang war nur wenig über die chronische Wirkung dieser verschiedenen PDL auf das peritoneale Mesothel bekannt. Daher wurden in dieser Arbeit sowohl die akuten als auch chronischen Effekte der unterschiedlichen PDL auf Vitalität und Funktion von HPMC untersucht. Alle verwendeten Lösungen wurden auf einen pH-Wert um 7.4 eingestellt, um den bekannten, akut toxischen Effekt des sauren Milieus auszuschließen. Die Zellvitalität wurde mittels des MTT-Assays und die spezifische Synthesefunktion der Zellen mittels der IL-1 β -stimulierten IL-6-Freisetzung der HPMC untersucht. Die akute und chronische Exposition von HPMC gegenüber hitzesterilisierten Peritonealdialyselösungen führte zu einer signifikanten Reduktion von Vitalität und Funktion der Zellen. Demgegenüber führte die Inkubation mit filtersterilisierten PDL und GDP-armen PDL zu einer weniger starken Beeinflussung von Vitalität und Funktion. Die aminosäurehaltige PDL als Alternative zu glukosehaltigen PDL beeinflusste weder akut noch chronisch die Vitalität bzw. Funktion der Zellen negativ. Hingegen unterschied sich in den akuten und chronischen Experimenten die icodextrinhaltige Lösung in ihrer negativen Wirkung auf Vitalität und Funktion von HPMC nicht wesentlich von der hitzesterilisierten PDL mit hohem Glukoseanteil. Zusammengefasst hat die Verringerung des Gehaltes an Glukosedegradationsprodukten in PDL mittels Filtersterilisation bzw. alternativer Sterilisation in Zweikammerbeuteln einen positiven Einfluss auf Vitalität und Funktion von HPMC in vitro. Der Ersatz des osmotischen Agens hingegen bedeutet nicht zwangsläufig eine bessere Biokompatibilität. So beeinflussen aminosäurehaltige PDL zwar weder Vitalität noch Funktion von HPMC wesentlich, doch führen icodextrinhaltige PDL zu keinem Biokompatibilitätsvorteil gegenüber konventionellen hitzesterilisierten PDL mit hohem GDP-Gehalt. Insgesamt bleibt zu hoffen, dass mit der klinischen Einführung neuer

Peritonealdialyselösungen ein wichtiger Schritt in Richtung der längerfristigen Erhaltung der peritonealen Membranfunktion gelingt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Metcalfe, W.; Simpson, M.; Khan, I. H.; Prescott, G. J.; Simpson, K.; Smith, W. C. und Mac-Leod, A. M. (2002): Scottish renal registry: Acute renal failure requiring renal replacement therapy: incidence and outcome., QJM 2002 [95], Seite 579-583.
- [2] Kribben, A.; Herget-Rosenthal, S.; Pietruck, F. und Philipp, T. (2003): Das akute Nierenversagen - Eine Übersicht, Dtsch.Med.Wochenschr. 2003 [128], Seite 1231-1236.
- [3] Frei, U. und Schober-Halstenberg, HJ (2002): Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2001/2002., Quasi-Niere.
- [4] National Kidney Foundation (2004): K/DOQI Clinical Guidelines for Chronic Kidney Disease: Executive Summary, National Kidney Foundation, New York [2002].
- [5] Van Biesen, W.; Vanholder, R. C.; Veys, N; Dhondt, A und Lameire, N. (2000): An Evaluation of an Integrative Care Approach for End-Stage Renal Disease Patients, J Am Soc Nephrol 11, Seite 116-125.
- [6] Vanholder, R.; Van Loo, A.; Heering, P.; Van Biesen, W.; Lambert, M. C.; Hesse, U.; Van Der Vennet, M.; Grabensee, M. und Lameire, N. (1999): Reduced incidence of acute renal graft failure in patients treated with peritoneal dialysis compared to hemodialysis., Am J Kidney Dis. 33, Seite 934-940.
- [7] Van Biesen, W.; Vanholder, R.; Van Loo, A.; Van Der Vennet, M. und Lameire, N. (2000): Peritoneal dialysis favorable influences immediate recovery of renal function after renal transplantation., Transplantation 27, Seite 508-514.
- [8] Diaz-Buxo, J.; Walker, P.; Burgess, W.; Farmer, C.; Chandler, J. und Faircloth, W. (1986): The influence of peritoneal dialysis on the outcome of transplantation., Int.J Artif.Organs 9, Seite 359-362.
- [9] Di Paolo, N. und Sacchi, G. (1990): Anatomy and physiology of the peritoneal membrane, Contrib.Nephrol 84, Seite 10-26.

- [10] Dobbie, J. W. (1989): Morphology of the peritoneum in CAPD, *Blood Purif.* 7 [2-3], Seite 74-85.
- [11] Holmes, C. J. (1994): Peritoneal host defense mechanisms in peritoneal dialysis, *Kidney Int.Suppl* 48, Seite S58-S70.
- [12] Dobbie, J. W. (1992): Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis, *Perit.Dial Int.* 12 [1], Seite 14-27.
- [13] Pollock, C. A.; Ibels, L. S.; Eckstein, R. P.; Graham, J. C.; Caterson, R. J.; Mahony, J. F. und Sheil, A. G. (1989): Peritoneal morphology on maintenance dialysis, *Am.J.Nephrol.* 9 [3], Seite 198-204.
- [14] Verger, C.; Brunschvicg, O.; Le Charpentier, Y.; Lavergne, A. und Vantelon, J. (1981): Structural and ultrastructural peritoneal membrane changes and permeability alterations during continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Proc.Eur.Dial.Transplant.Assoc.* 18, Seite 199-205.
- [15] Dobbie, J. W.; Lloyd, J. K. und Gall, C. A. (1990): Categorization of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients, *Adv.Perit.Dial* 6, Seite 3-12.
- [16] Di Paolo, N.; Sacchi, G.; De Mia, M.; Gaggiotti, E.; Capotondo, L.; Rossi, P.; Bernini, M.; Pucci, A. M.; Ibba, L. und Sabatelli, P. (1986): Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Nephron* 44 [3], Seite 204-211.
- [17] Williams, J. D.; Craig, K. J. ; Topley, N; Von Ruhland, C.; Fallon, M.; Newman, G. R.; Mackenzie, R. K. und Williams, G. T. (2002): Morphologic Changes in the Peritoneal Membrane of Patients with Renal Disease., *J Am Soc Nephrol* 13, Seite 470-479.
- [18] Rubin, J.; Herrera, G. A. und Collins, D. (1991): An autopsy study of the peritoneal cavity from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Am.J.Kidney Dis.* 18 [1], Seite 97-102.

- [19] Davies, S. J.; Phillips, L.; Naish, P. F. und Russell, G. I. (2001): Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis, *J.Am.Soc.Nephrol.* 12 [5], Seite 1046-1051.
- [20] Jörres, A.; Gahl, G. M.; Ludat, K.; Frei, U. und Passlick-Deetjen, J. (1997): In vitro biocompatibility evaluation of a novel bicarbonate-buffered amino-acid solution for peritoneal dialysis, *Nephrol Dial Transplant* 12 [3], Seite 543-549.
- [21] Steinhauer, H. B.; Frei, A.; Dreyling, K. W. und Schollmeyer, P. (1987): Changes of eicosanoid metabolism in CAPD-associated peritonitis, *Contrib.Nephrol.* 57, Seite 45-54.
- [22] Steinhauer, H. B. und Schollmeyer, P. (1986): Prostaglandin-mediated loss of proteins during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Kidney Int.* 29 [2], Seite 584-590.
- [23] Steinhauer, H. B.; Gunter, B. und Schollmeyer, P. (1985): Stimulation of peritoneal synthesis of vasoactive prostaglandins during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Eur.J.Clin.Invest* 15 [1], Seite 1-5.
- [24] Goldstein, C. S.; Bomalaski, J. S.; Zurier, R. B.; Neilson, E. G. und Douglas, S. D. (1984): Analysis of peritoneal macrophages in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients, *Kidney Int.* 26 [5], Seite 733-740.
- [25] Goldman, M.; Vandenabeele, P. ; Moulart, J.; Amraoui, Z.; Abramowicz, D.; Nortier, J.; Vanherweghem, J. L. und Fiers, W. (1990): Intraperitoneal secretion of interleukin-6 during continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Nephron* 56 [3], Seite 277-280.
- [26] Brauner, A.; Hylander, B. und Wretling, B. (1993): Interleukin-6 and interleukin-8 in dialysate and serum from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Am J Kidney Dis.* 22 [3], Seite 430-435.
- [27] Zemel, D.; Krediet, R. T.; Koomen, G. C.; Kortekaas, W. M.; Geertzen, H. G. und ten Berge, R. J. (1994): Interleukin-8 during peritonitis in patients treated with CAPD; an in- vivo model of acute inflammation, *Nephrol Dial Transplant* 9 [2], Seite 169-174.

- [28] Stylianou, E.; Jenner, L. A.; Davies, M.; Coles, G. A. und Williams, J. D. (1990): Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells, *Kidney Int.* 37 [6], Seite 1563-1570.
- [29] Jörres, A.; Ludat, K.; Lang, J.; Sander, K.; Gahl, G. M.; Frei, U.; DeJonge, K.; Williams, J. D. und Topley, N. (1996): Establishment and functional characterization of human peritoneal fibroblasts in culture: regulation of interleukin-6 production by proinflammatory cytokines, *J Am Soc Nephrol* 7 [10], Seite 2192-2201.
- [30] Topley, N.; Mackenzie, R.; Jorres, A.; Coles, G. A.; Davies, M. und Williams, J. D. (1993): Cytokine networks in continuous ambulatory peritoneal dialysis: interactions of resident cells during inflammation in the peritoneal cavity, *Perit.Dial Int.* 13 Suppl 2, Seite S282-S285.
- [31] Topley, N. und Williams, J. D. (1994): Role of the peritoneal membrane in the control of inflammation in the peritoneal cavity, *Kidney Int.Suppl* 48, Seite S71-S78.
- [32] Schindler, R.; Mancilla, J.; Endres, S.; Ghorbani, R.; Clark, S. C. und Dinarello, C. A. (1990): Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL- 6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood* 75 [1], Seite 40-47.
- [33] Kunkel, S. L.; Wiggins, R. C. ; Chensue, S. W. und Larrick, J. (1986): Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 137 [1], Seite 404-410.
- [34] Kunkel, S. L. und Chensue, S. W. (1985): Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 production, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 128 [2], Seite 892-897.
- [35] Plum, J.; Lordnejad, M. R. und Grabensee, B. (1998): Effect of alternative peritoneal dialysis solutions on cell viability, apoptosis/necrosis and cytokine expression in human monocytes [published erratum appears in *Kidney Int* 1998 Aug;54(2):677], *Kidney Int.* 54 [1], Seite 224-235.

- [36] Jörres, A.; Ludat, K.; Sander, K.; Dunkel, K.; Lorenz, F.; Keck, H.; Frei, U. und Gahl, G. M. (1996): The peritoneal fibroblast and the control of peritoneal inflammation, *Kidney Int.Suppl* 56, Seite S22-S27.
- [37] Jörres, A.; Gahl, G. M.; Topley, N.; Neubauer, A.; Ludat, K.; Muller, C. und Passlick-Deetjen, J. (1994): In-vitro biocompatibility of alternative CAPD fluids; comparison of bicarbonate-buffered and glucose-polymer-based solutions, *Nephrol Dial Transplant* 9 [7], Seite 785-790.
- [38] Hurst, SM; Wilkinson, T. S.; McLoughlin, R. M.; Jones, S.; Horluchi, S.; Yamamoto, N.; Rose-John, S.; Fuller, G. M.; Topley, N und Jones, S. A. (2001): IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation., *Immunity* 14, Seite 705-714.
- [39] Samuelsson, B. (1983): Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science* 220 [4597], Seite 568-575.
- [40] Samuelsson, B. (1983): Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res.* 11, Seite 1-13.
- [41] Jörres, A.; Bender, T. O.; Finn, A.; Witowski, J.; Frohlich, S.; Gahl, G. M.; Frei, U.; Keck, H. und Passlick-Deetjen, J. (1998): Biocompatibility and buffers: effect of bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluids on peritoneal cell function, *Kidney Int.* 54 [6], Seite 2184-2193.
- [42] Holmes, C. J. und Shockley, T. R. (2000): Strategies to Reduce Glucose Exposure in Peritoneal Dialysis, *Perit.Dial Int.* 20 [Suppl. 2], Seite 37-41.
- [43] Faller, B. (1996): Amino acid-based peritoneal dialysis solutions, *Kidney Int.Suppl* 56, Seite S81-S85.
- [44] Kjellstrand, P.; Martinson, E.; Wieslander, A. und Holmquist, B. (1995): Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: influence of time and temperature, *Perit.Dial Int.* 15 [1], Seite 26-32.

- [45] Kjellstrand, P.; Martinson, E.; Wieslander, A.; Kjellstrand, K.; Jeppsson, E.; Svensson, E.; Jarkelid, L.; Linden, T. und Olsson, L. F. (2001): Degradation in peritoneal dialysis fluids may be avoided by using low pH and high glucose concentration, *Perit.Dial.Int.* 21 [4], Seite 338-344.
- [46] Aufricht, C.; Endemann, M.; Bidmon, B.; Arbeiter, K.; Mueller, T.; Regele, H.; Herkner, K. und Eickelberg, O. (2001): Peritoneal dialysis fluids induce the stress response in human mesothelial cells, *Perit.Dial.Int.* 21 [1], Seite 85- 88.
- [47] Duwe, A. K.; Vas, S. I. und Weatherhead, J. W. (1981): Effects of the composition of peritoneal dialysis fluid on chemiluminescence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro, *Infect.Immun.* 33 [1], Seite 130-135.
- [48] Breborowicz, A.; Rodela, H und Oreopoulos, G. D. (1992): Toxicity of osmotic solutes on human mesothelial cells in vitro., *Kidney Int.* 41 [5], Seite 1280-1285.
- [49] Wieslander, A. P.; Nordin, M. K.; Kjellstrand, P. T. und Boberg, U. C. (1991): Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929, *Kidney Int.* 40 [1], Seite 77-79.
- [50] Gotloib, L.; Wajsbrot, V.; Shostak, A. und Kushnier, R. (1999): Effect of Hyperosmolality upon the Mesothelial Monolayer Exposed in vivo and in situ to a Mannitol-Enriched Dialysis Solution, *Nephron* 81, Seite 301-309.
- [51] Passlick-Deetjen, J. und Jaeckle-Meyer, I. (1998): Bicarbonate buffers in peritoneal dialysis, *Artif.Organs* 22 [1], Seite 17-19.
- [52] Mackenzie, R. K.; Jones, S.; Moseley, A.; Holmes, C. J.; Argyle, R.; Williams, J. D.; Coles, G. A.; Pu, K.; Faict, D. und Topley, N. (2000): In vivo exposure to bicarbonate/lactate- and bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluids improves ex vivo peritoneal macrophage function, *Am J Kidney Dis.* 35 [1], Seite 112-121.

- [53] Witowski, J.; Breborowicz, A. ; Topley, N.; Martis, L.; Knapowski, J. und Oreopoulos, D. G. (1997): Insulin stimulates the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in human peritoneal mesothelial cells, *Perit.Dial Int.* 17 [2], Seite 186-193.
- [54] Nilsson-Thorell, C. B.; Muscalu, N.; Andren, A. H.; Kjellstrand, P. T. und Wieslander, A. P. (1993): Heat sterilization of fluids for peritoneal dialysis gives rise to aldehydes, *Perit.Dial Int.* 13 [3], Seite 208-213.
- [55] Wieslander, A. P.; Kjellstrand, P. T. und Rippe, B. (1995): Heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: biological consequences of chemical alterations, *Perit.Dial Int.* 15 [7 Suppl], Seite S52-S59.
- [56] Jellum E; Borresen HC und Eldjarn L (1973): The presence of furan derivatives in patients receiving fructose-containing solutions intravenously, *Clin.Chim.Acta* 47 [2], Seite 191-201.
- [57] Linden T; Forsback, G.; Deppisch, R.; Henle T und Wieslander, A. (2001): 3-Deoxyglucosone, a promotor of advanced glycation end products in fluids for peritoneal dialysis, *Perit.Dial Int.* 1998 [18], Seite 290-293.
- [58] Linden T; Deppisch, R.; Kjellstrand, P.; Forsbäck, G. und Wieslander, A. (2002): 3,4-Dideoxyglucosone-3-Ene (3,4-DGE), a Cytotoxic Glucose Degradation Product in Peritoneal Dialysis Fluids, *Perit.Dial Int.* 22 [1], Seite 102-102.
- [59] Linden, T.; Cohen, A.; Deppisch, R.; Kjellstrand, P. und Wieslander, A. (2002): 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): a cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis, *Kidney Int.* 62 [2], Seite 697-703.
- [60] Martinson, E.; Wieslander, A. ; Kjellstrand, P. und Boberg, U. (1992): Toxicity of heat sterilized peritoneal dialysis fluids is derived from degradation of glucose, *ASAIO J.* 38 [3], Seite M370-M372.
- [61] Witowski, J.; Korybalska, K.; Wisniewska, J.; Breborowicz, A. ; Gahl, G. M.; Frei, U.; Passlick-Deetjen, J. und Jorres, A. (2000): Effect of glucose degradation products on human peritoneal mesothelial cell function, *J Am Soc Nephrol* 11 [4], Seite 729-739.

- [62] Witowski, J.; Wisniewska, J.; Korybalska, K.; Bender, T. O.; Breborowicz, A.; Gahl, G. M.; Frei, U.; Passlick-Deetjen, J. und Jorres, A. (2001): Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells, *J.Am.Soc.Nephrol.* 12 [11], Seite 2434-2441.
- [63] Dawney, A. B. St. J. und Millar, D. J. (1997): Glycation and Advanced Glycation End-Product Formation with Icodextrin and Dextrose, *Perit.Dial Int.* 17, Seite 52-58.
- [64] Nakayama, M.; Kawaguchi, Y.; Yamada, K.; Hasegawa, T.; Takazoe, K.; Katoh, N.; Hayakawa, H.; Osaka, N.; Yamamoto, H.; Ogawa, A.; Kubo, H.; Shigematsu, T.; Sakai, O. und Horiuchi, S. (1997): Immunohistochemical detection of advanced glycosylation endproducts in the peritoneum and its possible pathophysiological role in CAPD, *Kidney Int.* 51, Seite 182-186.
- [65] Inagi, R.; Miyata, T.; Yamamoto, T.; Suzuki, D.; Urakami, K.; Saito, A.; Van Ypersele, De Strihou und Kurokawa, K. (1999): Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis, *FEBS Lett.* 463 [3], Seite 260-264.
- [66] Miyata, T.; Sugiyama, S.; Saito, A. und Kurokawa, K. (2001): Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"), *Kidney Int.Suppl* 78, Seite S25-S31.
- [67] Mandl-Weber, S.; Cohen, C. D. ; Haslinger, B.; Kretzler, M. und Sitter, T. (2002): Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells, *Kidney Int.* 61 [2], Seite 570-578.
- [68] De Vriese, A. S.; Mortier, S. und Lameire, N. H. (2001): Glucotoxicity of the peritoneal membrane: the case for VEGF, *Nephrol.Dial.Transplant.* 16 [12], Seite 2299-2302.
- [69] Topley, N. (1997): In vitro biocompatibility of bicarbonate-based peritoneal dialysis solutions, *Perit.Dial Int.* 17 [1], Seite 42-47.

- [70] Brunkhorst, R. und Mahiout, A. (1995): Pyruvate neutralizes peritoneal dialysate cytotoxicity: maintained integrity and proliferation of cultured human mesothelial cells, *Kidney Int.* 48 [1], Seite 177-181.
- [71] Shostak, A.; Gotloib, L.; Kushnier, R. und Wajsbrot, V. (2000): Protective effect of pyruvate upon cultured mesothelial cells exposed to 2 mM hydrogen peroxide, *Nephron* 84 [4], Seite 362-366.
- [72] Hanning, R. M.; Balfe, J. W. und Zlotkin, S. H. (1987): Effectiveness and nutritional consequences of amino acid-based vs glucose-based dialysis solutions in infants and children receiving CAPD, *Am J Clin.Nutr.* 46 [1], Seite 22-30.
- [73] Young, G. A.; Dibble, J. B.; Taylor, A. E.; Kendall, S. und Brownjohn, A. M. (1989): A longitudinal study of the effects of amino acid-based CAPD fluid on amino acid retention and protein losses, *Nephrol Dial Transplant* 4 [10], Seite 900-905.
- [74] Jones, M. R.; Gehr, T. W.; Burkart, J. M.; Hamburger, R. J.; Kraus, A. P., Jr.; Piraino, B. M.; Hagen, T.; Ogrinc, F. G. und Wolfson, M. (1998): Replacement of amino acid and protein losses with 1.1% amino acid peritoneal dialysis solution, *Perit.Dial Int.* 18 [2], Seite 210-216.
- [75] Brulez, H. F.; van Guldener, C.; Donker, A. J. und ter Wee, P. M. (1999): The impact of an amino acid-based peritoneal dialysis fluid on plasma total homocysteine levels, lipid profile and body fat mass, *Nephrol Dial Transplant* 14 [1], Seite 154-159.
- [76] Jones, M.; Kalil, R.; Blake, P.; Martis, L. und Oreopoulos, D. G. (1997): Modification of an amino acid solution for peritoneal dialysis to reduce risk of acidemia, *Perit.Dial Int.* 17 [1], Seite 66-71.
- [77] Ronco, C. (1999): Peritoneal dialysis: the state of the art in Europe, *Am J Kidney Dis.* 33 [3], Seite I-III.
- [78] Mistry, C. D.; Gokal, R. und Peers, E. (1994): A randomized multicenter clinical trial comparing isosmolar icodextrin with hyperosmolar glucose solutions in CAPD. MIDAS Study Group. Multicenter Investigation of Icodextrin in Ambulatory Peritoneal Dialysis, *Kidney Int.* 46 [2], Seite 496-503.

- [79] Posthuma, N.; ter Wee, P. M.; Verbrugh, H. A.; Oe, P. L.; Peers, E.; Sayers, J. und Donker, A. J. (1997): Icodextrin instead of glucose during the daytime dwell in CCPD increases ultrafiltration and 24-h dialysate creatinine clearance, *Nephrol Dial Transplant* 12 [3], Seite 550-553.
- [80] Woodrow, G.; Stables, G.; Oldroyd, B.; Gibson, J.; Turney, J. H. und Brownjohn, A. M. (1999): Comparison of icodextrin and glucose solutions for the daytime dwell in automated peritoneal dialysis, *Nephrol Dial Transplant* 14 [6], Seite 1530-1535.
- [81] Peers, E. und Gokal, R. (1997): Icodextrin: overview of clinical experience, *Perit.Dial Int.* 17 [1], Seite 22-26.
- [82] Wang, T.; Cheng, H. H.; Heimbürger, O.; Waniewski, J.; Bergström, J. und Lindholm, B. (2000): Effect of peritonitis on peritoneal transport characteristics: glucose solution versus polyglucose solution, *Kidney Int.* 57 [4], Seite 1704-1712.
- [83] Goldsmith, D.; Jayawardene, S.; Sabharwal, N. und Cooney, K. (2000): Allergic reactions to the polymeric glucose-based peritoneal dialysis fluid icodextrin in patients with renal failure., *Lancet* 355 [11], Seite 897.
- [84] Jörres, A.; Topley, N.; Steenweg, L.; Müller, C.; Kottgen, E. und Gahl, G. M. (1992): Inhibition of cytokine synthesis by peritoneal dialysate persists throughout the CAPD cycle, *Am J Nephrol* 12 [1-2], Seite 80-85.
- [85] Carmichael, J.; Degraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. und Mitchell, J. B. (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.* 47 [4], Seite 936-942.
- [86] Wieslander, A. P. (1996): Cytotoxicity of peritoneal dialysis fluid - is it related to glucose breakdown products?, *Nephrol Dial Transplant* 11 [6], Seite 958-959.
- [87] Lamb, E. J.; Cattell, W. R. und Dawney, A. B. St. J. (1995): In vitro formation of advanced glycation end products in peritoneal dialysis fluid, *Kidney Int.* 47, Seite 1768-1774.

- [88] Zeier, M.; Schwenger, V.; Deppisch, R.; Haug, U.; Weigl, K.; Bahner, U.; Wanner, C.; Schneider, H.; Henle, T. und Ritz, E. (2003): Glucose degradation products in PD fluids: Do they disappear from the peritoneal cavity and enter the systemic circulation?, *Kidney Int.* 63, Seite 298- 305.
- [89] Morgan, L. W.; Wieslander, A. ; Davies, M.; Horiuchi, T.; Ohta, Y.; Beavis, M. J.; Craig, K. J.; Williams, J. D. und Topley, N (2003): Glucose degradation products (GDP) retard mesothelialization independently of D-glucose concentration., *Kidney Int.* 64 [5], Seite 1854-1866.
- [90] Wieslander, A. P.; Deppisch, R.; Svensson, E.; Forsback, G.; Speidel, R. und Rippe, B. (1995): In vitro biocompatibility of a heat-sterilized, low-toxic, and less acidic fluid for peritoneal dialysis, *Perit.Dial Int.* 15 [2], Seite 158-164.
- [91] Passlick-Deetjen, J. und Lage, C. (2000): Lactate-buffered and bicarbonate-buffered solutions with less glucose degradation products in a two-chamber system, *Perit.Dial Int.* 20 Suppl 2, Seite S42-S47.
- [92] Cooker, L. A.; Luneburg, P.; Faict, D.; Choo, C. und Holmes, C. J. (1997): Reduced glucose degradation products in bicarbonate/lactate-buffered peritoneal dialysis solutions produced in two-chambered bags, *Perit.Dial Int.* 17 [4], Seite 373-378.
- [93] Zareie, M.; Hekking, L. H. P. ; Welten, A. G. A.; Driesprong, B. A. J.; Schade-Eestermans, I. L.; Faict, D.; Leyssens, A.; Schalkwijk, C. G.; Beelen, R. H. J.; ter Wee, P. M. und van den Born, J (2003): Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury in vivo., *Nephrol Dial Transplant* 18, Seite 2629-2637.
- [94] Rippe, B.; Simonsen, O; Heimbürger, O.; Christensson, A; Haraldsson, B; Stelin, G; Weiss, L; Nielsen, FD; Bro, S; Friedberg, M und Wieslander, A. (2001): Long-term effect of a peritoneal dialysis fluid with less glucose degradation products, *Kidney Int.* 59, Seite 348-357.

- [95] Jonasson, P.; Albrektsson, A. ; Ljungman, S.; Wieslander, A. und Braide, M. (2003): Peritoneal leukocyte survival and respiratory burst responses in patients treated with a low glucos degradation and high pH peritoneal dialysis fluid., *Int.J Artif.Organs* 26 [2], Seite 121-128.
- [96] Brulez, H. F.; Heezius, E. C. ; de Fijter, C. W.; Oe, L. P.; Verhoef, J. und Verbrugh, H. A. (1994): In vitro compatibility of a 1.1% amino acid containing peritoneal dialysis fluid with phagocyte function, *Adv.Perit.Dial* 10, Seite 241-244.
- [97] Brulez, H. F.; Dekker, H. A.; Oe, P. L.; Verbeelen, D.; ter Wee, P. M. und Verbrugh, H. A. (1996): Biocompatibility of a 1.1% amino acid-containing peritoneal dialysis fluid compared to a 2.27% glucose-based peritoneal dialysis fluid, *Nephron* 74 [1], Seite 26-32.
- [98] Garosi, G.; Gaggiotti, E.; Monaci, G.; Brardi, S. und Di Paolo, N. (1998): Biocompatibility of a peritoneal dialysis solution with amino acids: histological evaluation in the rabbit, *Perit.Dial Int.* 18 [6], Seite 610-619.
- [99] Chan, T. M.; Leung, J. K. H.; Sun, Y.; Lai, K. N.; Tsang, R. C. W. und Yung, S. (2003): Different effects of amino acid-based and glucose-based dialysate from peritoneal dialysis patients on mesothelial cell ultrastructure and function., *Nephrol Dial Transplant* 18, Seite 1086-1094.
- [100] Frampton, J. E. und Plosker, G. L. (2003): Icodextrin. A Review of its Use in Peritoneal Dialysis., *Drugs* 63 [19], Seite 2079-2105.
- [101] Liberek, T.; Topley, N.; Mistry, C. D.; Coles, G. A.; Morgan, T.; Quirk, R. A. und Williams, J. D. (1993): Cell function and viability in glucose polymer peritoneal dialysis fluids, *Perit.Dial Int.* 13 [2], Seite 104-111.
- [102] de Fijter, C. W.; Verbrugh, H. A.; Oe, L. P.; Heezius, E.; Donker, A. J.; Verhoef, J. und Gokal, R. (1993): Biocompatibility of a glucose-polymer-containing peritoneal dialysis fluid, *Am J Kidney Dis.* 21 [4], Seite 411-418.

- [103] Rooney, O. B.; Dodd, P. D.; Gokal, R. und Walker, M. G. (1996): Dialysis fluid cytotoxicity and inhibition of host defence in cultured human mesothelial cells are neutralized rapidly with incubation in the peritoneum, *Nephrol Dial Transplant* 11 [12], Seite 2472-2477.
- [104] Cooker, L. A.; Choo, C. G.; Luneburg, P.; Lamela, J. und Holmes, C. J. (1999): Effect of icodextrin peritoneal dialysis solution on cell proliferation in vitro, *Adv.Perit.Dial* 15, Seite 17-20.
- [105] Gotloib, L.; Shostak, A. und Wajsbrot, V. (2000): Effects of osmotic agents upon the in vivo exposed mesothelial monolayer, *Perit.Dial Int.* 20 Suppl 2, Seite S11-S14.
- [106] Gotloib, L.; Wajsbrot, V. und Shostak, A. (2002): Mesothelial Dysplastic Changes and Lipid Peroxidation Induced by 7.5% Icodextrin., *Nephron* 92, Seite 142-155.
- [107] Gotloib, L.; Wajsbrot, V. und Shostak, A. (2003): Icodextrin-Induced Lipid Peroxidation Disrupts The Mesothelial Cell Cycle Engine, *Free Radical Biology & Medicine* 34 [4], Seite 419-428.
- [108] Beavis, M. J.; Williams, J. D.; Hoppe, J. und Topley, N. (1997): Human peritoneal fibroblast proliferation in 3-dimensional culture: modulation by cytokines, growth factors and peritoneal dialysis effluent, *Kidney Int.* 51 [1], Seite 205-215.
- [109] Jörres, A.; Gahl, G. M. und Frei, U. (1994): Peritoneal dialysis fluid biocompatibility: does it really matter?, *Kidney Int.Suppl* 48, Seite S79-S86.
- [110] Witowski, J.; Topley, N.; Jorres, A.; Liberek, T.; Coles, G. A. und Williams, J. D. (1995): Effect of lactate-buffered peritoneal dialysis fluids on human peritoneal mesothelial cell interleukin-6 and prostaglandin synthesis, *Kidney Int.* 47 [1], Seite 282-293.

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, Thorsten Onno Bender, geb. am 12. September 1972 in Berlin, dass ich die vorliegende Dissertation:

Untersuchungen zum Effekt von Glukose, Glukosedegradationsprodukten und alternativen osmotischen Agenzien in Peritonealdialyselösungen auf die Viabilität und Funktion peritonealer Mesothelzellen

selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Schriften dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Thorsten Onno Bender

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Durchführung der Experimente unterstützt haben und so die Projekte trotz aller Schwierigkeiten vollendet werden konnten.

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Achim Jörres für Überlassung des Themas und die besondere Unterstützung bei allen Projekten, die wir auch über diese Arbeit hinaus bisher umsetzen konnten.

Herrn Dozent Dr. Janusz Witowski für alle praktische Hilfe und die für mich stets sehr wertvollen und lehrreichen Diskussionen.

Frau Sibylle Fröhlich für die exzellente Einführung in die Methodik.

Meinen lieben Mitdoktoranden Katharina Dunkel und André Finn.

Und meiner Ehefrau Susanne Schwarz für das Verständnis für viele verbrachte Stunden im Labor und ihre praktische Mithilfe, wenn der Arbeitstag gar nicht enden wollte.